

Aus dem Institut für Pathologie
(Direktor: Professor Dr. med. C. Röcken)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**PROLIFERATIONSAKTIVITÄT VON PLASMOZYTOMEN
DURCH DEN NACHWEIS DER TOPOISOMERASE II α**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

JESSICA BOKELMANN

aus Bremen

Kiel, 2009

- Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Klapper
- Berichterstatter:** Prof. Dr. Siebert

Tag der mündlichen Prüfung: 1. Juli 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel den 1. Juli 2009

gez.: Prof. Dr. Stick

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	5
2.1	Untersuchungsgut	5
2.2	Immunhistochemie	6
2.2.1	Reagenzien und Hersteller	6
2.2.2	Erstellung der Schnitte	8
2.2.3	Monoklonaler Antikörper Ki-S1	8
2.2.4	Monoklonale Immunglobulin G-Leichtkettenantikörper	9
2.2.5	Sekundäre Antikörper	9
2.2.6	Tertiärer Antikörper	9
2.2.7	Immunhistochemische Doppelfärbung der Topoisomerase II α und der IgG-Leichtketten	10
2.2.8	Puffer- und Verdünnungslösungen	11
2.2.9	Prinzip der Doppelfärbung	12
2.2.10	Durchführung der Doppelfärbung	14
2.2.11	Beispiele der durchgeführten Doppelfärbung	16
2.3	Patientendaten	17
2.4	Fragebogen	17
2.5	Auswertung	18
2.5.1	Auswertung der Färbung	18
2.5.2	Statistische Auswertung	19
3.	Ergebnisse	20
3.1	Vergleich der durch Ki-S1 ermittelten Proliferationsaktivität der Plasmozytome mit der Infiltration des Knochenmarks, den klinischen Daten und den Ergebnissen aus dem Fragebogen	20
4.	Diskussion	37
5.	Zusammenfassung	44
6.	Literaturverzeichnis	46
7.	Danksagung	54
8.	Lebenslauf	55

1. Einleitung

Das Plasmozytom ist die häufigste lymphoproliferative Erkrankung des Knochenmarks, die durch klonale Vermehrung von B-Lymphozyten und Plasmazellen und durch monoklonale Expression von Immunglobulinen bzw. deren Leichtketten charakterisiert ist. Ein Prozent aller malignen und 10 bis 15% aller hämatologischen Erkrankungen sind Plasmozytome. Die Inzidenz wird in der Literatur mit 4/100000/Jahr angegeben. Meist sind ältere Menschen betroffen, der Altersmedian liegt für Männer bei 68, für Frauen bei 70 Jahren. Männer sind häufiger betroffen, das Verhältnis liegt bei 3:2 (Kubagawa et al. 1979; Caligaris-Cappio et al. 1985; Salmon und Cassady 1993; Fauci et al. 1998; Liebisch und Peest 2007).

Obwohl die Genese des Plasmozytoms unbekannt ist, findet man verschiedene Faktoren, die Einfluss auf seine Entstehung nehmen. Ähnlich anderen Tumorerkrankungen wird die Mehrstufen-Pathogenese favourisiert. Nach antigener Stimulation kommt es zu einer benignen Expansion eines B-Zellklons. Im weiteren Verlauf erfolgt eine Mutation, bzw. Transformation einer B-Zelle, aus der sich der maligne Klon, das Plasmozytom, entwickelt.

Bei Plasmozytomen lassen sich zytogenetisch oder mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) multiple chromosomale Veränderungen nachweisen, wie Hypo-, Hyper- oder Pseudodiploidie, sowie Trisomien, Monosomien und Deletionen an Chromosom 13 und 14, ebenso wie Translokationen oder Deletionen am Chromosom 1p. Desweiteren lassen sich bei einem Teil der Patienten Translokationen an den Genen, die für die schwere Kette der Immunglobuline kodieren, nachweisen (t(4;14), t(11;14)). Betroffene Onkogene sind u.a. *FGFR3* oder *CCND1*, bei bestimmten Patientengruppen konnten Überexpressionen der *MYC*- oder *RAS*-Onkogene, bzw. Mutationen im p53- bzw. Rb-1-Gen nachgewiesen werden. Eine genetische Prädisposition spielt eine Rolle, da sich beispielsweise unter der schwarzen Bevölkerung der Vereinigten Staaten eine erhöhte Inzidenz nachweisen lässt, ebenso erkranken Blutsverwandte eines Plasmozytompatienten häufiger. (Debes-Marun et al. 2003; Alexandrakis et al. 2004; Gertz 2007; Liebisch und Peest 2007)

Das Plasmozytom hat verschiedene Ausbreitungsformen. Meist dominiert eine diffuse oder multilokuläre Infiltration des Knochenmarks, selten findet man ein solitäres Knochenplasmozytom oder ein solitäres extramedulläres Plasmozytom, letzteres ist meist im Nasopharynxbereich lokalisiert. Zwei Prozent der Patienten bieten das klinische Bild der Plasmazellleukämie. Nach der Immunglobulinexpression werden IgG-, IgA-, IgM-, IgD-, IgE- und Leichtkettenplasmozytome unterschieden, in zwei bis drei Prozent der Fälle finden sich asekretorische Plasmozytome.

Als eines der ersten Symptome klagen Patienten über Knochenschmerzen, die meist von Wirbelsäule und Rippen ausgehen. Häufig treten pathologische Frakturen auf. Ursächlich finden sich Osteolysen, die einerseits durch Verdrängung der Knochensubstanz durch Tumorzellmasse und andererseits durch gleichzeitige Aktivierung der Osteoklasten bedingt sind. Große konfluierende Herde treten vorwiegend an Schädel, Sternum, Clavicula, Becken und in den Wirbelkörpern auf. In diesem Zusammenhang können Hyperkalziämien auftreten, die ihrerseits zu renalen Komplikationen führen können.

Ein weiteres Hauptsymptom ist die bei 80% der Patienten auftretende Anämie, bedingt durch Verdrängung bzw. Wachstumshemmung der erythropoetischen Zellreihe im Knochenmark.

Eine gesteigerte Infektanfälligkeit führt bei einem Großteil der Patienten zu schweren bakteriellen Infektionen, die häufig mit dem klinischen Bild einer Pneumonie oder Pyelonephritis imponieren. Ursächlich wird vor allem die Hypogammaglobulinämie angesehen, bedingt durch verminderte Produktion und vermehrten Abbau der Immunglobuline, die durch die nicht neoplastischen Plasmazellen produziert werden. Durch massive Expression eines Immunglobulins durch den neoplastischen Plasmazellklon tritt in der Eiweisselektrophorese ein scharfer Peak, die M-Komponente, auf. Bei ca. 20% der Patienten werden nur Leichtketten exprimiert, die im Urin als sog. Bence Jones Proteine nachweisbar sind.

Diagnostisch führend sind die Plasmazellvermehrung im Knochenmark ($> 10\%$ der Knochenmarkzellen), die M-Komponente in Serum oder Urin und der Nachweis einer Hyperkalziämie und /oder einer Niereninsuffizienz und /oder einer Anämie und / oder der Nachweis von Knochenläsionen, wie Osteolysen oder Osteoporose.

Die aktuelle Behandlungsform besteht in einer Hoch-Dosis-Chemotherapie gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation, soweit keine Kontraindikationen aufgrund von Vorerkrankungen oder hohem Lebensalter bestehen.

Die supportive Therapie nimmt insbesondere bei Komplikationen der Grundkrankheit einen besonderen Stellenwert ein (Salmon und Cassady 1993; Alexanian und Dimopoulos 1994; Alexanian und Dimopoulos 1995; Fauci et al. 1998; Dimopoulos et al. 2006; Liebisch und Peest 2007).

Das von Durie et al. 1975 eingeführte klinische Staging-System beruhte auf der Korrelation der Tumorzellmasse der Plasmozytome mit klinischen Parametern, wie Schwere der Anämie und Ausmaß der Osteolysen, Höhe des Serumcalciums und der M-Komponente. Eine Stadieneinteilung erfolgte, um optimale Chemotherapiestrategien zu entwickeln und um unter adäquater Therapie das Überleben der Patienten zu verlängern. Auch die aktuelle Klassifikation, das International Staging System for Multiple Myeloma, orientiert sich an laborchemischen Parametern (β_2 -Mikroglobulin und Albumin) (Greipp et al. 2005).

Weiterhin ist eine Heilung von Plasmozytompatienten nicht möglich, daher sind reliable Einschätzungen der Prognose für diese Patienten wichtig. Wiederholt wurde die Progression der Erkrankung mit der Tumorzellkinetik bzw. der Proliferation korreliert. Die Arbeitsgruppe um Durie und Salmon zeigte bereits 1980, dass die Zellkinetik (labelling index = die Tumorzellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden) eines Plasmozytoms Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung hat und ein unabhängiger Prognosefaktor ist.

Die Proliferation eines Tumors kann durch verschiedene quantitative Methoden erfasst werden, z.B. das Auszählen von Mitosefiguren (Baak 1991) oder den Nachweis radioaktiv markierter DNA-Vorläufer (Steel 1977).

Nachdem seit 1975 durch Köhler und Milstein die Herstellung monoklonaler Antikörper (MAK) ermöglicht worden ist, stehen eine Reihe von MAK zur Verfügung, die eine Bestimmung der Proliferationsaktivität gestatten (Gerdes et al. 1984; Kreipe et al. 1993 a und b; Kreipe und Parwaresch 1993; Kellner et al. 1997 und 2000; Frahm et al. 1998 und 1999; Rudolph et al. 1998).

Der MAK Ki-S1 erkennt ein Zellzyklus assoziiertes Enzym, die Topoisomerase II α .

Dieses Enzym wird nur in proliferierenden, insbesondere neoplastischen Geweben exprimiert, im Gegensatz zu ihrer Isoform, der Topoisomerase II β , die auch in nicht proliferierenden Zellen nachweisbar ist. Die Topoisomerase II α spielt bei der DNA-Replikation eine zentrale Rolle. Sie ist verantwortlich für die Reparatur bei DNA-Strangbrüchen (Kellner et al. 1997 und 2000; Turley et al. 1997).

Durch Ermittlung der Proliferationsaktivität durch Ki-S1 konnten verschiedene Autoren bei anderen Malignomen zeigen, dass die Expression mit dem klinischen Verlauf korreliert, bzw. dass Aussagen zur Prognose abgeleitet werden können (Sampson et al. 1992; Kreipe et al. 1993 a und b; Thiele et al. 1994; Rudolph et al. 1995, 1997 und 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einer immunhistologischen Doppelfärbung die Proliferationsaktivität der Plasmazytome durch den Proliferationsmarker Ki-S1 in Kombination mit einem Plasmazellmarker bestimmt.

In immunhistochemisch gefärbten Knochenmarkschnitten ist die Zellidentifikation ein zentrales Problem und wird in fast allen bisherigen Arbeiten über die Proliferationsaktivität von Plasmazytomen nicht beachtet. Der Einsatz von Plasmazellmarkern, wie beispielsweise CD 38 oder CD 138, löst dieses Problem nicht. Das Knochenmark ist der physiologische Sitz normaler Plasmazellen, die in den lymphatischen Keimzentren als Resultat einer sekundären Immunantwort entstehen. Sie bevölkern als terminal differenzierte B-Zellen das Knochenmark, wo sie mehrere Dekaden alt werden können. Entscheidend für die Fragestellung dieser Arbeit war die Darstellung der Proliferationsaktivität neoplastischer Plasmazellen. Diese Plasmazellpopulation ließ sich auf der Basis einer Immunglobulinleichtkettenrestriktion identifizieren. Aus diesem Grunde wurde die Topoisomerasedarstellung mit der jeweils ausschließlich exprimierten Leichtkette kombiniert.

Nach Ermittlung der Proliferationsaktivität der Plasmazytome wurde 6 Jahre nach Diagnosestellung ein Fragebogen an die behandelnden Ärzte gesandt, um weitere Informationen über den Krankheitsverlauf der Patienten, deren Gewebeproben untersucht wurden, zu erhalten.

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Proliferationsaktivität von Plasmazytomen und deren Korrelation mit den klinischen Daten und dem Verlauf.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsgut

Untersuchungsgut waren Beckenkammtrepanate von 50 Patienten, bei denen 1991 die Diagnose eines Plamozytoms gestellt wurde. Die hämatopathologische Untersuchung der Beckenstanze und Bestätigung der klinischen Diagnose erfolgte im Institut für Hämatopathologie im Zentrum für Pathologie und angewandte Krebsforschung der Kieler Universität.

Die Gewebepräparate wurden von den einsendenden Kliniken in 10%igem Formalin fixiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte im Institut für Hämatopathologie. Zunächst wurden die Beckenkammtrepanate in 10%iger Essigsäure für 12 Stunden entkalkt und anschließend über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Nach Abschließen der Entwässerung mit Xylol wurden die Präparate in Paraffin (Paraplast, Sherwood Medical, Clinica, BRD) eingebettet.

Von allen Patienten waren Hämatoxylin-Eosin-, Giemsa-, PAS- und Fe-Färbungen der Plasmozytome vorhanden. Weitere immunhistochemische Untersuchungen bezüglich der jeweiligen Leichtkettenexpression ergaben, dass ausschließlich die Leichtkette κ bei 32, die Leichtkette λ bei 18 Patienten exprimiert wurde. Dies war für die Doppelfärbung von Bedeutung, um den jeweiligen Leichtkettenantikörper einsetzen zu können. Weiterhin war der Infiltrationsgrad der Beckenkammtrepanate durch das Plasmozytom, sowie klinische Daten, wie Alter und Geschlecht, bei einem Großteil der Patienten auch der Hämoglobinwert und die Thrombozytenzahl zum Diagnosezeitpunkt bekannt.

Im Rahmen eines Fragebogens wurden sechs Jahre nach Einsendung des Beckenkammtrepanates Informationen über Therapiebeginn, Therapiedauer und Überlebenszeit der Patienten aus den betreuenden Kliniken angefordert.

2.2. Immunhistochemie

2.2.1 Reagenzien und Hersteller

ABComplex HRP: DAKOPATTS, Hamburg, BRD

Alkalische Phosphatase: P 6774, Sigma, St. Louis, USA

3-Aminopropyltriethoxysilane (APES): Sigma

Antikörper:

- *Ki-S1*: Institut für Hämatopathologie im Zentrum für Pathologie und angewandte Krebsforschung der Universität Kiel, BRD
- *Monoklonaler Anti-Lambda Clon 4-19-9 von der Maus*: Institut für Hämatopathologie im Zentrum für Pathologie und angewandte Krebsforschung der Universität Kiel
- *Monoklonaler Anti-Kappa Clon TB 28-2*: American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA
- *Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins, biotinyliert*: E 354, DAKOPATTS
- *Monoklonaler Antikörper (MAK) von der Maus gegen alkalische Phosphatase*: Institut für Hämatopathologie im Zentrum für Pathologie und angewandte Krebsforschung der Universität Kiel

Aqua ad injectabile = Aqua dest.: Fresenius, Bad Homburg, BRD

Aqua bidest.: Institut für Pathologie in Kiel, BRD

Becher (verschiedene Größen): Vitlab, Seeheim-Jugenheim, BRD

Bechergläser (verschiedene Größen): Schott, Mainz, BRD

Binokulares Mikroskop: Zeiss, Oberkochen, BRD

Bovine Serumalbuminlösung (BSA): Sigma

Calciumchlorid (CaCl₂): Walter, Kiel, BRD

Citrat: Merck, Darmstadt, BRD

Deckgläser: Menzel, Braunschweig, BRD

Dimethylformamid: Merck

Eichmittel: Eydam-WTW, Weilheim, BRD

Erlenmeyerkolben (verschiedene Größen): Schott

Färbegestell: Faust, Hamburg, BRD

Färbekästen nach Schifferdecker: Schierf, Ostheim, BRD

Filterpapier ($\varnothing 90$ mm), 595: Schleicher & Schüll, Dassel, BRD

Glaskasten mit Deckel (9 x 11 x 7 cm): Schott

Hämalaun nach Mayer: Sigma

Humanserum (inaktiviert): Institut für Transfusionsmedizin in Kiel, BRD

Kaisers Glyceringelatine: Merck

Levamisol: Sigma

Magnetrührer (MR 3000): Heidolph, Kelheim, BRD

Magnetrührstäbe (30 mm, $\varnothing 6$ mm, gerade, zylindrisch): Brandt, Wertheim, BRD

Methanol: Merck

Mikrodoppelspatel (18/8, 150 mm, 40/5): Bochem, Weilburg, BRD

Mikrowelle, Modell 2-4 V 14 (B)/(W): Sharp Electronics (Europe) GmbH, Hamburg, BRD

Naphtol-AS-Biphosphat: Sigma

Natriumchlorid (NaCl): Merck

Natriumnitrit (NaNO₂): Merck

Natronlauge (1n-NaOH): Merck

Neufuchsin: Fluka Chemika, Buchs, CH

Objektträger (Super Frost, weiss): Menzel

Paraffinstreckbad (GFL): Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, BRD

Peroxidase Substrate Kit DAB SK-4100: Vector Laboratories Inc., Burlingame, California, USA

pH-Meter (pH 521): Eydram WTW

Phosphat buffered solution (PBS): Dulbeco's Life Technologies, Paisley, Schottland

Pipetten (20, 50, 100, 500, 1000 μ l): Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg, BRD

Pipettenspitzen: Eppendorf-Netheler-Hinz

Propandiol: Merck

Reagenzglasschüttelgerät (Minishaker MS1): IKA-Werke, Hüttersheim, BRD

Reaktionsgefäße (1,5 ml): Eppendorf-Netheler-Hinz

Rührspatel: Faust

Salzsäure (1n-HCl): Merck,

Schüttelwasserbad (SW 21 D): Julabo, Seelbach, BRD

Tri(hydroxymethyl)aminomethan (Tris): 8382, Merck

Trichter (100-77-13 mm): Kartell, Italien

Tris-Base: Sigma

Tris-HCl: Sigma

Trockenschrank (Vacutherm, 6060M): Heraeus, Hanau, BRD

Waagen:

- *Analysen- und Präzisionswaage (Type 18.01)*: Sartorius, Göttingen, BRD
- *Schulwaage (portable)*: Sartorius

2.2.2 Erstellung der Schnitte

Die erforderliche Schnittdicke lag bei 4 µm, daher wurden die Paraffinblöcke auf -20°C gekühlt und mit dem Mikrotom der Firma Leica, Bensheim, geschnitten.

Danach wurden die Schnitte im temperierten Wasserbad entspannt und auf mit 3-Aminopropyltriethoxylane (APES) beschichtete Objektträger gezogen. Anschließend wurden die Präparate für 24 Stunden im Inkubator bei 37 °C getrocknet.

2.2.3 Monoklonaler Antikörper Ki-S1

Der MAK Ki-S1 (Sampson et al. 1992) wurde durch die Arbeitsgruppe für Fusion und Zellkultur des Institutes für Hämatopathologie im Zentrum für Pathologie und angewandte Krebsforschung in Kiel, BRD, zur Verfügung gestellt. Ki-S1 ist ein Proliferationsantikörper, dessen Antigen die Topoisomerase II α ist (Boege et al. 1995). Dieses Enzym findet sich in allen proliferierenden Zellen und ist in den Phasen G1, S, G2 und M des Zellzyklus nachweisbar. Eine verstärkte Expression kann in neoplastischen Geweben nachgewiesen werden. Zellulär ist sie im Zellkern lokalisiert und spielt bei der DNA-Replikation eine zentrale Rolle (Kellner et al. 1997; Turley et al. 1997).

2.2.4 Monoklonale Immunglobulin G-Leichtkettenantikörper

Der MAK gegen die Leichtkette Lambda (anti lambda 4-14-9) stammte von der Maus und wurde durch die Arbeitsgruppe für Fusion und Zellkultur des Institutes für Hämatopathologie im Zentrum für Pathologie und angewandte Krebsforschung der Universität Kiel hergestellt und zur Verfügung gestellt.

Der MAK gegen die Leichtkette Kappa (anti-kappa Clon TB 28-2) stammte ebenfalls von der Maus und wurde über die Firma American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA, bezogen.

Je nach Leichtkettenexpression wurde entweder der Antikörper gegen die Kappa (κ)- oder Lambda (λ)-Leichtkette verwendet. Die Antikörper sind monoklonal, d.h. sie interagieren mit einem einzigen Epitop auf der Leichtkette, und binden daher spezifisch nur an κ - bzw. λ -Leichtketten.

2.2.5 Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper fungieren als Brücke zwischen primärem und tertiärem Antikörper, der mit dem den Farbstoff umsetzenden Enzym gekoppelt ist. Sie sind gegen das Fc-Fragment der primären Antikörper gerichtet.

Gegen den MAK Ki-S1 der Maus und gegen die Leichtkettenantikörper wurde ein sekundärer polyklonaler, biotinylierter Antikörper des Kaninchens eingesetzt, der von der Firma DAKOPATTS bezogen wurde (Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins: E 354, DAKOPATTS; Hamburg).

2.2.6 Tertiärer Antikörper

Der tertiäre Antikörper ist mit dem Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert die Farbreaktion. Der MAK gegen die alkalische Phosphatase stammte von der Maus und wurde durch die Arbeitsgruppe für Fusion und Zellkultur des Institutes für Hämatopathologie im Zentrum für Pathologie und angewandte Krebsforschung der Universität Kiel hergestellt und zur Verfügung gestellt.

2.2.7 Immunhistochemische Doppelfärbung der Topoisomerase II α und der IgG - Leichtketten

In der immunhistochemischen Doppelfärbung wurden die Streptavidin-Biotin-Brückenmethode (ABC) nach Hsu et al. 1981, und die Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) nach Cordell et al. 1984, eingesetzt. Zu Beginn der Färbung wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten in Xylol deparaffiniert, anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Das Blocken der endogenen Peroxidase erfolgte mit 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung in Methanol für 15 Minuten. Daraufhin wurden die Schnitte in Leitungswasser gespült.

Zur Demaskierung der antigenen Bindungsstellen wurden die Präparate für 10 Minuten bei 1000 Watt und weitere 15 Minuten bei 750 Watt in der Mikrowelle in 0,01 molarem Citratpuffer erhitzt (Shi et al. 1991; Cantoretti et al. 1992; Kreipe et al. 1993 b). Danach wurden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gekühlt und abschließend mit TBS-Puffer gespült.

Im ersten Färbeschritt wurden die Präparate mit dem ersten primären Antikörper Ki-S1 (Kernfärbung) in zwei verschiedenen Verdünnungen für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss an diesen und alle folgenden Inkubationsschritte erfolgte das Spülen mit TBS-Puffer. Danach wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper, Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin, für 30 Minuten inkubiert. Nach dem Spülen erfolgte die Inkubation mit dem ABComplex HRP für 30 Minuten. Zur ersten Farbreaktion wurden die Präparate mit dem Peroxidase-Substrat Kit einschließlich Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB) für zwei bis zehn Minuten zur Farbentwicklung inkubiert. Nach erneutem Waschen der Schnitte in Leitungswasser und abschließend in TBS-Puffer wurde die Färbung mit dem zweiten primären Antikörper gegen die Immunglobulinleichtkette fortgesetzt. Je nach Ergebnis der immunhistochemischen Voruntersuchung wurde der monoklonale κ - oder λ -Leichtkettenantikörper in der jeweiligen Verdünnung eingesetzt und für eine Stunde mit dem Präparat inkubiert. Nach erneutem Spülen wurde als sekundärer Antikörper erneut der Kaninchen-anti-Maus-Antikörper eingesetzt, als tertiärer Antikörper der MAK gegen alkalische Phosphatase, welcher zuvor mit alkalischer Phosphatase versetzt worden war.

Dieser und der vorherige Schritt wurden zweimal wiederholt, um bei der APAAP (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase)-Entwicklung nach Leder und Stutte (1975) die Farbentwicklung zu intensivieren. Dazu wurde im Ansatz eine 5%ige Neufuchsinlösung verwendet.

Abschließend erfolgte die Färbung der Zellkerne in Hämalaun nach Mayer für einige Minuten und schließlich wurden die Präparate in Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.8 Puffer- und Verdünnungslösungen

TBS-Waschpuffer:

Die Stammlösung, die sich aus 0,14 m NaCl und 0,05 m Tris in Aqua dest. zusammensetzte, wurde mit 37%iger HCl-Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Zum Spülen der Präparate nach jedem Inkubationsschritt wurde diese Lösung im Verhältnis 1:5 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt.

Citratpuffer:

Eine 0,01 m Citratlösung in Aqua dest. wurde hergestellt und mit 1n-NaOH auf einen pH-Wert von 6 eingestellt.

Verdünnungslösung für die primären Antikörper:

Als Verdünnung wurde 1% bovines Serumalbumin (BSA) in TBS verwendet, das auf einen pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 eingestellt wurde.

Verdünnungslösung für die sekundären Antikörper:

Als Verdünnung wurde inaktiviertes Humanserum, 1:10 mit TBS gemischt, verwendet.

Für die APAAP-Entwicklung wurden folgende Pufferlösungen benötigt:

1. Entwicklungspuffer:

Aus 8,7 g NaCl, 1,5 g Tris-HCl, 4,9 g Tris-Base und 1000 ml Aqua bidest. wurde eine 0,05 m Trislösung hergestellt.

2. Propandiolpuffer:

21 g Propandiol wurden in 1000 ml Aqua bidest. gelöst, entsprechend einer 0,2 m Propandiollösung.

3. Neufuchsin-Lösung:

5,0 g Neufuchsin wurden in 100 ml 2 n Salzsäure gelöst, entsprechend einer 5%igen Neufuchsinlösung.

2.2.9 Prinzip der Doppelfärbung

In der Doppelfärbung an Plasmazytomen wurden mittels Immunhistochemie zwei Antigene innerhalb einer Plasmazelle markiert und färberisch dargestellt. Unter Verwendung des paraffingängigen MAK Ki-S1 wurde die während der Proliferation aktivierte Topoisomerase II α nachgewiesen. Durch Darstellung dieses im Zellkern vorkommenden Antigens konnte die Proliferationsaktivität der untersuchten Plasmazytome bestimmt werden. Zur Differenzierung der Zellart im hochproliferativen Knochenmark wurden Antikörper gegen die im Cytosol der malignen Plasmazelle monoklonal exprimierte Leichtkette eingesetzt. Auf diese Weise konnten Plasmazytomzellen eindeutig identifiziert werden.

Die einzelnen Färbeschritte liefen sequentiell ab. Zuerst wurde die Topoisomerase II α im Kern mit dem monoklonalen Ki-S1-Antikörper markiert. Der sekundäre Antikörper koppelte an das Fc-Fragment des primären Antikörpers. Durch Biotinylierung des sekundären Antikörpers erfolgte die Reaktion mit dem zugesetzten Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex über eine Avidin-Biotin-Bindung. Die Farbreaktion wurde durch Umsetzen des Chromogens Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid durch die Peroxidase erreicht, so dass ein brauner Farbstoff entstand.

Im zweiten Färbeabschnitt wurden die monoklonalen Antikörper gegen die Leichtketten mit dem Präparat inkubiert. Der sekundäre Antikörper war identisch mit dem des ersten Färbeschrittes. Um Kreuzreaktionen mit den Fc-Fragmenten der beiden primären Antikörper zu vermeiden, wurde im ersten Färbeschritt der sekundäre Antikörper im Überschuss appliziert, um alle Bindungsstellen zu besetzen.

Im folgenden Inkubationsschritt wurde erneut ein von der Maus stammender Antikörper gegen das Enzym Alkalische Phosphatase eingesetzt. Nach Zugabe des Enzyms und der Reaktion mit dem tertiären Antikörper erfolgte nach dem Auftragen die Reaktion des tertiären mit dem sekundären Antikörper ebenfalls durch Bindung an das Fc-Fragment. Zur farblichen Markierung der Leichtketten im Zytoplasma wurde Neufuchsin durch die Phosphatase in einen roten Farbstoff umgesetzt (Abb. 1).

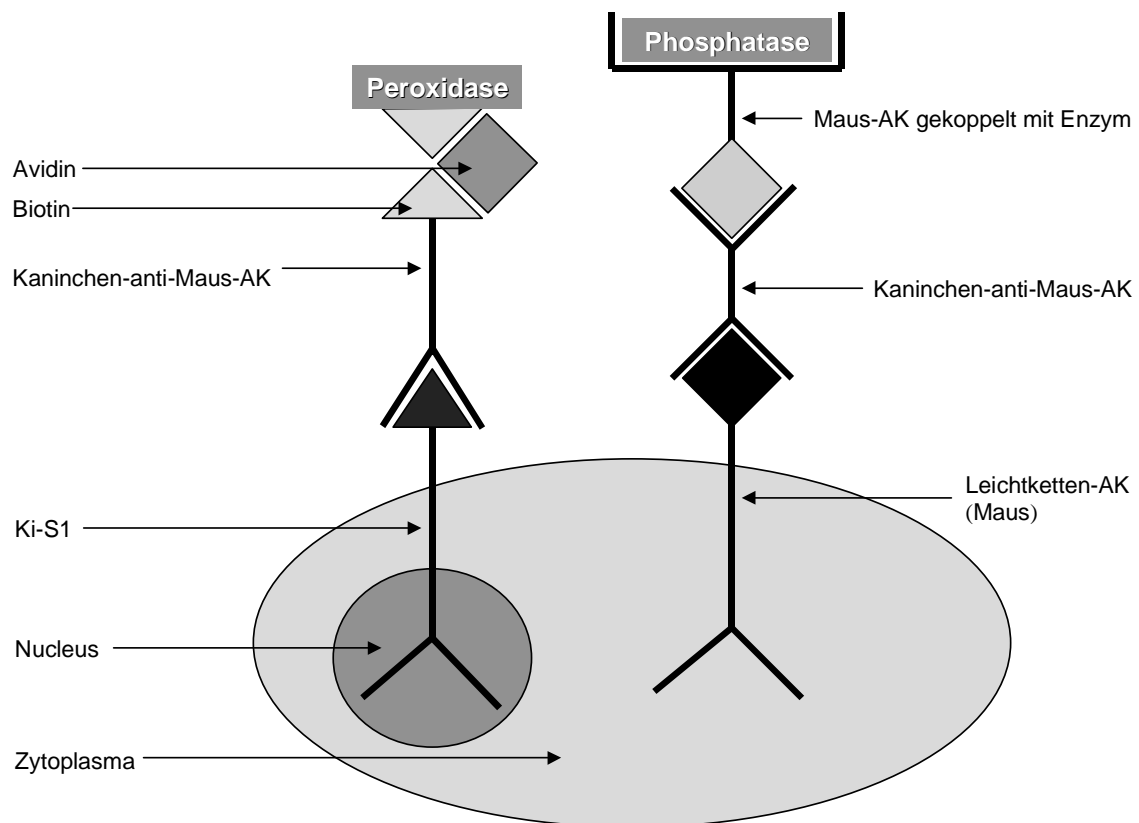


Abbildung 1:

Schematische Darstellung der durchgeführten Doppelfärbung an Plasmazytomen unter Verwendung des MAK Ki-S1 und des IgG-Leichtkettenantikörpers

2.2.10 Durchführung der Doppelfärbung

- 1) Deparaffinieren der Gewebeschnitte in Xylol (30 Min.) und anschließendes Rehydrieren in der absteigenden Alkoholreihe (3 x 100% Ethanol, 2 x 96% Ethanol, 1 x 80% Ethanol, 3 x Aqua dest.)
- 2) Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung in Methanol (30 Min). Anschließend Spülen mit Leitungswasser.
- 3) Kochen der Schnitte in der Mikrowelle in 0,01 molarem Citratpuffer für 10 Minuten bei 1000 Watt und für weitere 15 Minuten bei 750 Watt. Anschließend Abkühlen unter fließendem Leitungswasser und Spülen mit TBS-Puffer.
- 4) Inkubation der Präparate mit dem ersten primären Antikörper für 60 Min.:
Ki-S1-Ascites 1:60.000 oder 1:100.000 verdünnt in 1%igem BSA.
Anschließend Spülen mit TBS-Puffer.
- 5) Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 30 Min.:
Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin, biotinyliert, 1:100 verdünnt in 10%igem Humanserum.
Anschließend Spülen mit TBS-Puffer.
- 6) Inkubation der Schnitte mit dem ABComplex HRP, 1:100 in TBS verdünnt, für 30 Min.. Anschließend Spülen mit TBS-Puffer
- 7) Versetzen der Präparate mit dem Peroxidase Substrat KIT und DAB zur Darstellung der Peroxidaseaktivität für 10 Min.. Anschließend Waschen der Schnitte in Leitungswasser und abschließend Spülen mit TBS.
- 8) Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper für 1 Stunde, je nach immunhistochemischer Untersuchung:
κ-Leichtkettenantikörper (Clon TB 28-2) von der Maus: Zellkulturüberstand
oder
λ-Leichtkettenantikörper (Clon 4-19-9) von der Maus: Zellkulturüberstand

- 9) Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 30 Min.:

Kaninchen-anti-Maus-Immunglobuline 1:100 verdünnt in 10%igem Humanserum
Anschließend Spülen mit TBS-Puffer.

- 10) Das Enzym alkalische Phosphatase und der monoklonale Mausantikörper gegen die alkalische Phosphatase wurden im Verhältnis 1:100 gemischt (10 mg ad. 1 ml Zellkulturüberstand) und ca. 200 µl wurden auf die Schnitte aufgetragen. Inkubation für 15 Min.. Anschließend Spülen mit TBS-Puffer.

- 11) Wiederholung der unter Punkt 9) und 10) aufgeführten Arbeitsschritte.

- 12) Bei der APAAP-Entwicklung wurden folgende Ansätze verwendet:

a) 87,5 ml Entwicklungspuffer wurden mit 31 ml Propandiolpuffer versetzt und unter Zusatz von 1m NaOH auf einen pH-Wert von 9,75 eingestellt. Im Anschluss Zusetzen von 50 mg Levamisol zur Hemmung der endogenen Phosphatase.

b) Lösung von 25,0 mg NaNO_2 in 625 µl Aqua bidest,

c) 63 mg Naphtol-AS-Biphosphat wurden in 750 µl Dimethylformamid gelöst, entsprechend einer 0,18 molaren Lösung.

Die Ansätze wurden folgendermaßen verarbeitet: 250 µl Neufuchsinlösung (s.o.) wurden mit b) vermengt. Nach 1 Min. Reaktionszeit wurde a) und anschließend c) hinzugefügt. Der pH wurde mit 1m HCl auf 8,8 eingestellt. Nach Filtration der Lösung wurden die Schnitte für ca. 10 Min. mit der Lösung zur Farbentwicklung inkubiert.

- 13) Nach dem Spülen unter Leitungswasser wurde die Kerngegenfärbung mit Hämalanlösung nach Mayer durchgeführt, und die Schnitte wurden in Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.11 Beispiele der durchgeführten Doppelfärbung

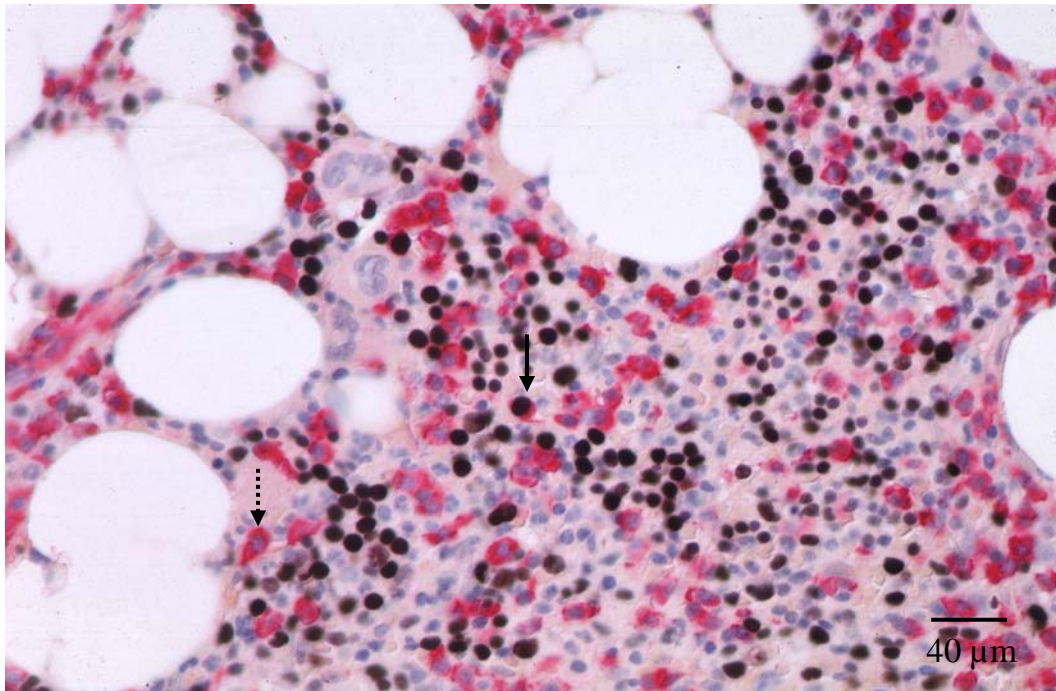


Abbildung 2

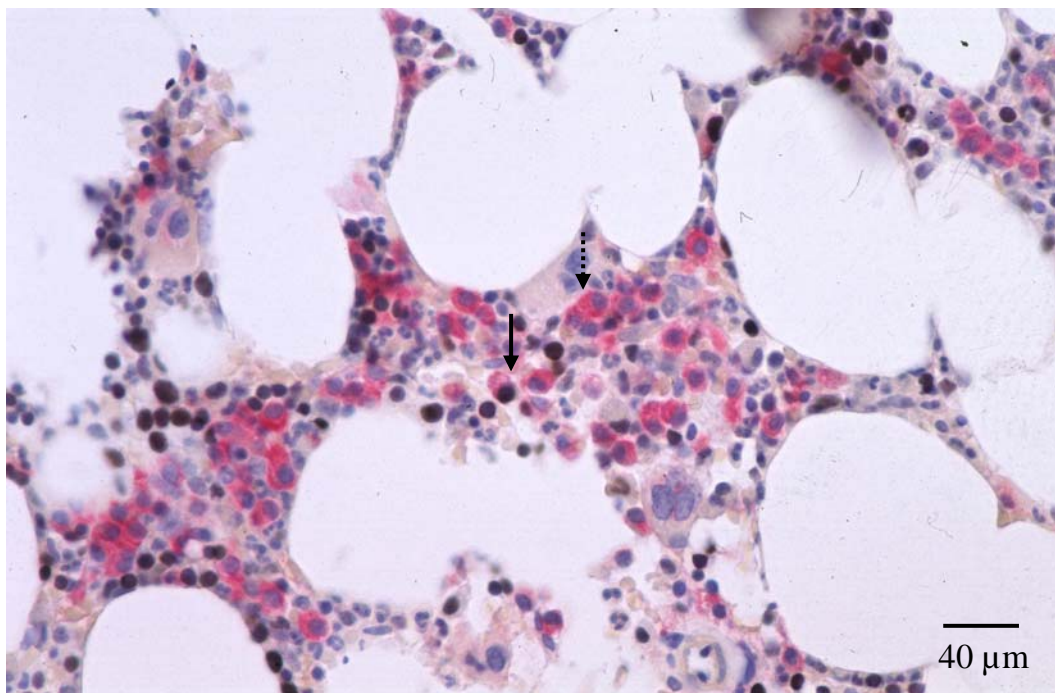


Abbildung 3

Abbildungen 2 und 3:

Darstellung Ki-S1-positiver (durchgezogener Pfeil) und negativer (gestrichelter Pfeil) Plasmazellen eines Plasmozytoms in einem 4 µm dünnen Paraffinschnitt eines Beckenkammtrepanates

2.3. Patientendaten

Von den 50 Patienten, bei denen 1991 die Diagnose eines Plasmozytoms durch Untersuchung eines Beckenkammtrepanates im Institut für Hämatopathologie in Kiel gestellt wurde, waren Alter, Geschlecht und die κ - oder λ -Leichtkettenexpression bekannt. Bei 66% der Patienten waren zum Diagnosezeitpunkt der aktuelle Hämoglobinwert und bei 60% der aktuelle Thrombozytenwert bekannt.

2.4 Fragebogen

Plasmozytompatienten aus dem Jahre 1991

Patienten-Name (Initialen: Nachname, Vorname):	«Patienteninitialen»
Geburtsdatum:	«Patientengeburtstag»
Eingangsnummer:	E/91/«ENummer»
Diagnosestellung:	Monat __ __, Jahr __ __,
Chemotherapie :	
-erstmals:	Monat __ __, Jahr __ __,
-wieviele Zyklen insgesamt:	__ __,
Therapieerfolg:	
-komplette Remission	__, am __ __. __ __. __ __ __ __,
-partielle Remission	__, am __ __. __ __. __ __ __ __,
-Progression	__, seit __ __. __ __. __ __ __ __,
Überleben:	
-Patient/-in lebt	__,
-Patient/-in verstorben	__, am __ __. __ __. __ __ __ __,
-unbekannt	__,
Todesursache:	
-bedingt durch das Plasmozytom	__,
-therapiebedingt	__,
-andere Ursache	__,
-welche?	_____

Sechs Jahre, nachdem bei 50 Patienten die Diagnose eines Plasmozytoms gestellt worden war, wurde an alle betreuenden Kliniken der obige Fragebogen versandt. Im Rücklauf konnten die Daten von 22 Patienten statistisch ausgewertet werden. Im Vergleich der Merkmale, die bei allen Patienten bekannt waren, ergaben sich zwischen der Patientengruppe mit und ohne Verlaufsinformation keine statistisch signifikanten Unterschiede, so dass die Ergebnisse repräsentativ für die gesamte Patientengruppe sind.

2.5 Auswertung

2.5.1 Auswertung der Färbung

Das Zytoplasma der Plasmazellen wurde mittels des Leichtkettenantikörpers durch eine rote Farbreaktion markiert. Eine Ki-S1-positve Plasmazelle zeigte zusätzlich eine Braunfärbung des Kerns. Ki-S1-negative Zellkerne waren blau, entsprechend der Kerngegenfärbung mit Hämalan.

Bei jeder Färbung wurde als Kontrolle ein Kryostatschnitt einer Tonsille mitgeführt. Falsch-Ki-S1-positve Färbungen ließen sich durch deutliche Kernfärbung nicht proliferierender Stromazellen in diesem Präparat nachweisen, falsch-Ki-S1-negative Färbungen zeigen keine Anfärbung von Mitosen im Kontrollpräparat. Um die korrekte Anwendung der Leichtkettenantikörper zu überprüfen, wurde in jeder Färbung kontrolliert, ob zusätzlich zu den Plasmazellen andere Zellen angefärbt waren (falsch positiv), oder ob Plasmazellen nicht angefärbt waren (falsch negativ).

Bei 100-facher Vergrößerung in Ölimmersionstechnik wurden pro Präparat 100 Plasmazellen durch zwei unabhängige Untersucher ausgezählt. Im Trepanat wurden Bereiche mit gut erhaltenem Gewebe und mit deutlicher Kernfärbung und geringer unspezifischer Färbung ausgewählt. Die Proliferationsaktivität der Plasmozytome wurde durch die Anzahl Ki-S1-positiver Plasmazellen bezogen auf die Gesamtzahl der ausgezählten Plasmazellen bestimmt und in Prozent angegeben.

2.5.2 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit freundlicher Unterstützung durch das Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg mit dem Programmpaket SAS 6.12 der Firma SAS Institute Inc., North Carolina, USA.

Definition: Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha \leq 5\%$; Wahrscheinlichkeit $p < 0,05 =$ signifikant.

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der durch Ki-S1 ermittelten Proliferationsaktivität der Plasmozytome mit der Infiltration des Knochenmarks, den klinischen Daten und den Ergebnissen aus dem Fragebogen

Mittels Doppelfärbung wurden 50 Beckenkammtrepanate von Patienten mit einem 1991 diagnostizierten Plasmozytom untersucht. Sechs Jahre nach Diagnosestellung wurde an alle betreuenden Zentren ein Fragebogen versandt, um Informationen über den weiteren Verlauf zu erhalten (Tab. 1).

Der Anteil von Männern und Frauen am Patientengut war je 25 Patienten. Die Patienten waren zum Untersuchungszeitpunkt zwischen 44 und 85 Jahren alt (Abb. 4), der Mittelwert, ebenso wie der Median lagen bei 67 Jahren, 1. bzw. 3. Quantil bei 60 bzw. 75 Jahren.

Bei der Expression der Leichtketten λ und κ zeigte sich ein Verhältnis von 1:2, 18 Plasmozytome zeigten eine λ - und 32 eine κ -Leichtkettenexpression. Zwischen beiden Geschlechtern fanden sich hinsichtlich der Leichtkettenexpression keine signifikanten Unterschiede. (Chi-Quadrat-Test: Wert: 1,389; Wahrscheinlichkeit $p = 0,239$) (Tab. 2).

Eine Korrelation zwischen dem Geschlecht und den stetigen Merkmalen (Alter, Proliferation, Infiltration, Hämoglobin-, Thrombozytenwert, Therapiedauer, Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Tod) ließ sich nicht nachweisen. Auch der Leichtkettentypus ließ sich nicht mit diesen Messgrößen korrelieren.

Die Proliferationsaktivität lag bei den 50 untersuchten Plasmozytomen zwischen 0 und maximal 19%, mit einem Mittelwert von 4,08%. Der Median lag bei 2,7, das 1. und 3. Quantil bei 0,7 bzw. 5,5% (Tab. 3). Dementsprechend zeigten 75% der untersuchten Plasmozytome eine Proliferationsaktivität $\leq 5,5\%$. Einen detaillierten Überblick über die Häufigkeitsverteilung der Proliferationsaktivität geben Tabelle 4 und Abbildung 5.

Im Mittel war der Infiltrationsgrad der Beckenkämme 27,7%, (Minimum 5%, Maximum 100%). Der Median betrug 20%, das 1. Quantil 10% und das 3. 75% der untersuchten Patienten hatten eine Infiltration des Knochenmarks von weniger als 30% (Tab. 5).

Im Vergleich der Proliferationsaktivität mit dem Infiltrationsgrad zeigten die untersuchten Plasmozytome insgesamt eine niedrige Proliferationstendenz, sowohl bei niedriger, als auch bei hoher Infiltration. 31 der untersuchten Patienten hatten ein bis zu 30% mit Plasmazellen infiltrierte Knochenmark, deren Proliferationsaktivität $\leq 5\%$ war.

Zwischen Proliferationsaktivität und Infiltrationsgrad ließ sich ein Trend darstellen ($\alpha = 0,27$; $p = 0,06$), (Tab. 6, Abb. 6).

Korrelierte man die beiden quantitativen Merkmale Proliferation und Alter, zeigte sich keine Abhängigkeit, so dass bei den untersuchten Patienten das Lebensalter zum Diagnosezeitpunkt keinen Einfluss auf die Proliferationsaktivität des Tumors hatte. Ebenso war die Proliferationsaktivität vom Geschlecht ($p = 0,55$) und vom Leichtkettentypus unabhängig ($p = 0,71$).

Der laborchemische Parameter Hämoglobinwert, der bei einem Großteil der Patienten bekannt war, zeigte im Vergleich mit der Proliferation eine signifikante Abhängigkeit ($p = 0,039$). Je höher die Proliferationsaktivität des Plasmozytoms, desto niedriger der Hämoglobinwert, die Regressionsgrade ($y = -0,8x + 14,3$) beschreibt diese Abhängigkeit (Abb. 7).

Zwischen Proliferationsaktivität und Thrombozytenzahl ließ sich keine Abhängigkeit nachweisen (Abb. 9).

Korrelationen zwischen Infiltrationsgrad und Hämoglobinwert oder Thrombozytenzahl bei Diagnosestellung waren statistisch nicht signifikant. Auch eine Abhängigkeit des Infiltrationsgrades vom Geschlecht oder Leichtkettentyp war statistisch nicht zu belegen.

Interessant war, dass sich bei Korrelation des Lebensalters mit dem Infiltrationsgrad ein Trend zeigte, der bei jüngerem Erkrankungsalter auf einen erhöhten Infiltrationsgrad hinwies ($\alpha = 0,27$; $p = 0,06$) (Abb. 8).

Die Mittelwerte für den Hämoglobin- bzw. Thrombozytenwert lagen bei 11,46 g/dl, bzw. 225/nl.

Ein höheres Lebensalter korrelierte nicht mit dem Ausmaß der Anämie oder Thrombozytopenie.

Die Ergebnisse der Fragebögen waren für 22 Patienten auswertbar. Die Daten der Patienten, über die durch den Fragebogen Verlaufsinformationen vorlagen, waren repräsentativ für die Gesamtpatientengruppe. Nach Aufteilung der Patienten in zwei Gruppen, a) mit Verlaufsinformationen und b) ohne Verlaufsinformationen, ergaben sich bei Vergleich der bei allen Patienten bekannten Merkmale Proliferation, Infiltration, Alter und Geschlecht keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Auch unter Miteinbeziehung von Hämoglobinwert und Thrombozytenzahl, die bei einem Großteil der Patienten bekannt waren, ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Daher können die Ergebnisse repräsentativ für das gesamte Patientenkollektiv betrachtet werden.

Über das Überleben (Patientenstatus) lagen von 22 Patienten Daten vor. Die Patienten wurden nach den Kriterien 'Patient lebt', 'Patient verstorben' und 'keine Angabe' eingeteilt (Tab. 7). Aus den Daten ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Überlebens zwischen den beiden Geschlechtern aufzeigen (Chi-Quadrat-Test: Wert: 4,8; Wahrscheinlichkeit: $p = 0,09$) (Tab. 8). Alter, Leichtkettenexpression, Proliferation, Infiltration, Hämoglobin- und Thrombozytenwert, sowie die Zeitspanne bis zum Therapiebeginn (D I) hatten keinen Einfluss auf die Mortalität der untersuchten Patienten.

Der Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Therapiebeginn (D I) konnte nur bei 19 Patienten ermittelt werden und lag im Mittel bei 15,6 Monaten (Minimum 0 Monate, Maximum 76 Monate).

Eine Korrelation zwischen der Zeitspanne von Diagnose bis Therapiebeginn (D I) und den quantitativen Werten, Alter, Proliferation, Infiltration, Hämoglobin- und Thrombozytenwert, und den qualitativen Merkmalen, Geschlecht und Leichtkettenexpression, war nicht nachweisbar.

Eine multiple Korrelation zwischen der Proliferation und den quantitativen Merkmalen, Infiltration, Alter, Hämoglobin- und Thrombozytenwert konnte nicht dargestellt werden.

Tabelle 1:

Daten von 50 Plasmozytompatienten aus dem Jahr 1991 - Proliferationsaktivität, Infiltrationsgrad, Hämoglobinwert, Thrombozytenzahl, Alter, Geschlecht, Immunglobulin-G-Leichtkettentypus, Status des Patienten und Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Therapiebeginn bzw. Todeszeitpunkt

Eingangsnummer	Proliferation [%]	Infiltration [%]	Hb - Wert [g/dl]	Thrombozyten [/nl]	Alter [Jahre]
194/91	3,00	20	11,30	299,00	67
1617/91	4,00	70	-	-	79
1793/91	5,50	10	13,00	646,00	74
1795/91	13,00	20	11,10	240,00	74
1804/91	7,00	30	14,80	227,00	76
2207/91	1,00	30	10,40	104,00	77
2293/91	4,00	10	-	-	61
3907/91	1,30	10	-	-	70
4058/91	11,10	40	7,70	-	79
4634/91	3,00	30	13,10	259,00	67
7413/91	2,00	10	-	-	55
8174/91	4,10	10	12,90	306,00	85
8223/91	0,00	30	13,10	168,00	56
8331/91	1,30	20	12,20	260,00	64
8490/91	15,70	30	8,00	125,00	65
8790/91	6,30	70	7,30	230,00	79
8993/91	11,00	40	9,10	82,00	48
9136/91	3,00	20	-	-	79
9463/91	3,00	10	14,80	215,00	58
9751/91	7,50	30	9,40	212,00	57
9760/91	3,00	30	13,30	127,00	73
10124/91	2,70	10	-	-	58
10131/91	8,00	10	10,50	164,00	63
10329/91	0,70	20	-	-	52
11075/91	19,00	10	12,20	-	60
12300/91	1,00	20	12,50	262,00	72
12309/91	0,50	20	-	-	55
12315/91	2,30	20	10,40	87,00	59
12320/91	7,60	50	11,30	252,00	62
12501/91	1,70	30	-	-	72
13104/91	1,30	100	9,80	134,00	74
13393/91	12,00	80	-	-	67
14077/91	0,70	10	-	-	46
14477/91	4,70	10	9,50	107,00	70
15442/91	0,30	15	12,90	188,00	66
16370/91	0,30	20	14,40	375,00	44
16622/91	0,50	20	-	-	67
17351/91	1,00	15	13,70	235,00	81
17574/91	0,30	10	-	201,00	54
17968/91	8,00	40	9,90	-	62
17983/91	0,50	10	-	-	70
18345/91	9,30	100	12,50	293,00	81

Eingangsnummer	Proliferation [%]	Infiltration [%]	Hb - Wert [g/dl]	Thrombozyten [/nl]	Alter [Jahre]
18347/91	4,70	30	10,00	221,00	81
18351/91	1,00	20	14,80	171,00	76
18871/91	0,70	10	-	-	75
19239/91	0,00	20	7,90	347,00	65
19513/91	3,00	30	12,10	-	63
19517/91	2,30	70	-	-	67
19524/91	0,30	10	-	-	80
19794/91	0,00	5	12,30	219,00	60

Eingangsnummer	Geschlecht (*)	Leichtketten	Status (*)	D I [Monate] (*)	D II [Monate] (*)
194/91	1	lambda	-	-	-
1617/91	1	kappa	-	-	-
1793/91	2	kappa	-	-	-
1795/91	1	lambda	2	1	9
1804/91	2	lambda	-	-	-
2207/91	2	lambda	1	4	Pat. lebt
2293/91	1	kappa	2	38	63
3907/91	2	lambda	3	-	-
4058/91	2	kappa	2	0	24
4634/91	1	kappa	-	-	-
7413/91	1	lambda	1	47	Pat. lebt
8174/91	2	lambda	-	-	-
8223/91	1	kappa	2	1	17
8331/91	1	kappa	1	24	Pat. lebt
8490/91	1	kappa	-	-	-
8790/91	1	kappa	-	-	-
8993/91	1	lambda	-	-	-
9136/91	1	kappa	1	76	Pat. lebt
9463/91	2	lambda	-	-	-
9751/91	1	lambda	-	-	-
9760/91	1	kappa	-	-	-
10124/91	2	kappa	2	-	0
10131/91	1	lambda	-	-	-
10329/91	2	kappa	-	-	-
11075/91	2	kappa	1	66	Pat. lebt
12300/91	2	kappa	2	32	52
12309/91	1	kappa	3	-	-
12315/91	2	kappa	-	-	-
12320/91	1	kappa	2	3	Pat. tot
12501/91	1	lambda	2	1	13
13104/91	2	kappa	3	0	-
13393/91	2	kappa	-	-	-
14077/91	2	kappa	3	-	-
14477/91	1	kappa	2	0	47
15442/91	2	lambda	3	-	-
16370/91	2	kappa	-	-	-
16622/91	1	kappa	-	-	-
17351/91	2	lambda	-	-	-
17574/91	1	kappa	1	3	Pat. lebt
17968/91	2	lambda	-	-	-

Eingangsnummer	Geschlecht (*)	Leichtketten	Status (*)	D I [Monate] (*)	D II [Monate] (*)
17983/91	1	kappa	-	-	-
18345/91	1	kappa	-	-	-
18347/91	2	lambda	-	-	-
18351/91	1	kappa	-	-	-
18871/91	1	kappa	1	0	Pat. lebt
19239/91	2	kappa	-	-	-
19513/91	2	kappa	-	-	-
19517/91	2	lambda	-	-	-
19524/91	2	kappa	-	-	-
19794/91	2	lambda	3	0	-

* [Anmerkung:

- Geschlecht: 1 = weiblich; 2 = männlich
- Status: 1 = Patient lebt; 2 = Patient verstorben; 3 = keine Angabe
- D I: Zeitraum in Monaten nach Diagnosestellung bis zum Therapiebeginn
- D II: Zeitraum in Monaten nach Diagnosestellung bis zum Todeszeitpunkt, bzw. Angabe, ob der Patient lebt oder verstorben ist.]

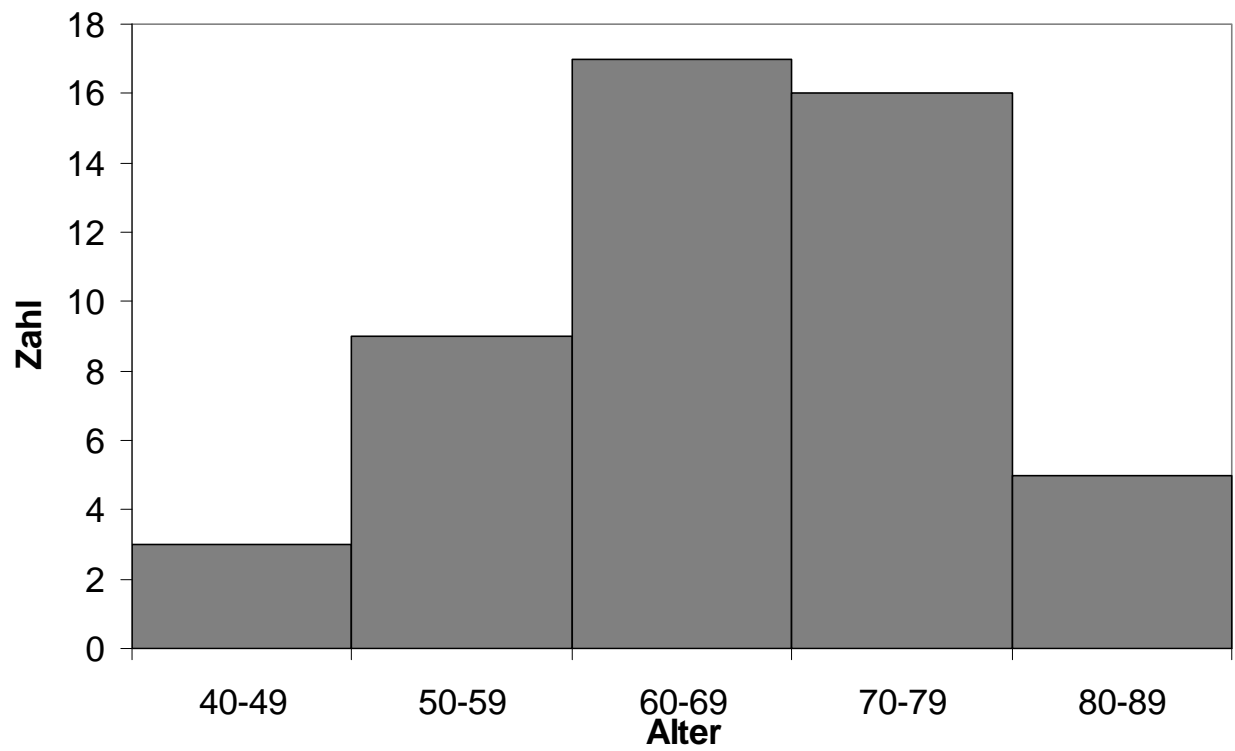


Abbildung 4:

Altersverteilung der 50 untersuchten Plasmozytompatienten zum Zeitpunkt der Diagnose

Tabelle 2:

Verteilung der IgG-Leichtkettenexpression (kappa / lambda) bezogen auf das Geschlecht

Häufigkeit	kappa	lambda	gesamt
weiblich	18	7	25
männlich	14	11	25
gesamt	32	18	50

Tabelle 3:

Charakterisierung der untersuchten quantitativen Merkmale, Proliferation, Infiltration, Hämoglobinwert, Thrombozytenwert, Alter, Zeitraum zwischen Diagnosestellung und Therapiebeginn, bei 50 Plasmozytompatienten

Variable	N	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum
Proliferation (%)	50	4,08	4,43	0	19,00
Infiltration (%)	50	27,70	22,95	5,00	100,00
Hb (g/dl)	33	11,46	2,14	7,30	14,80
Thrombozyten (/nl)	30	225,20	108,95	82,00	646,00
Alter (Jahre)	50	66,90	10,04	44,00	85,00
D I (Monate)	19	15,58	24,51	0	76,00

Tabelle 4:

Absolute und kumulative Häufigkeitsverteilung der Proliferationsaktivität bei 50 untersuchten Plasmazytomen

Proliferation (%)	Absolute Häufigkeit	Prozentangabe (%)	Kumulative Häufigkeit	Kumulative Prozentangabe (%)
0,00 - 0,50	10	20,0	10	20,0
0,51 - 1,00	7	14,0	17	34,0
1,01 - 2,00	5	10,0	22	44,0
2,01 - 3,00	9	18,0	31	62,0
3,01 - 4,00	2	4,00	33	66,0
4,01 - 5,00	3	6,0	36	72,0
5,01 - 7,00	3	6,0	39	78,0
7,01 - 10,0	5	10,0	45	90,0
10,01 - 19,0	6	12,0	50	100,0

Tabelle 5:

Absolute und kumulative Häufigkeitsverteilung des Infiltrationsgrades bei 50 untersuchten Plasmozytomen

Infiltration (%)	Absolute Häufigkeit	Prozentangabe (%)	Kumulative Häufigkeit	Kumulative Prozentangabe (%)
5,00	1	2,0	1	2,0
10,00	15	30,0	16	32,0
15,00	2	4,0	18	36,0
20,00	12	24,0	30	60,0
30,00	10	20,0	40	80,0
40,00	3	6,0	43	86,0
50,00	1	2,0	44	88,0
70,00	3	6,0	47	94,0
80,00	1	2,0	48	96,0
100,00	2	4,0	50	100,0

Tabelle 6:

Vergleich der Proliferationsaktivität mit Infiltrationsgrad bei 50 untersuchten Plasmozytomen

	Infiltrationsgrad <= 30%	Infiltrationsgrad > 30%
Proliferationsaktivität < 5%	31	4
Proliferationsaktivität >= 5%	9	6

Tabelle 7:

Absolute und kumulative Häufigkeitsverteilung des Patientenstatus sechs Jahre nach Diagnose eines Plasmozytoms (1 = Patient lebt; 2 = Patient verstorben; 3 = keine Angabe) von 22 Patienten

Status	Absolute Häufigkeit	Prozentangabe (%)	Kumulative Häufigkeit	Kumulative Prozentangabe (%)
1	7	31,8	7	31,8
2	9	40,9	16	72,7
3	6	27,3	22	100,0

Tabelle 8:

Verteilung des Patientenstatus sechs Jahre nach Diagnose eines Plasmozytoms (1 = Patient lebt; 2 = Patient verstorben; 3 = keine weitere Angabe) von 22 Patienten bezogen auf das Geschlecht

Häufigkeit	Patient lebt	Patient verstorben	keine Angabe	gesamt
Weiblich	5	6	1	12
Männlich	2	3	5	10
Gesamt	7	9	6	22

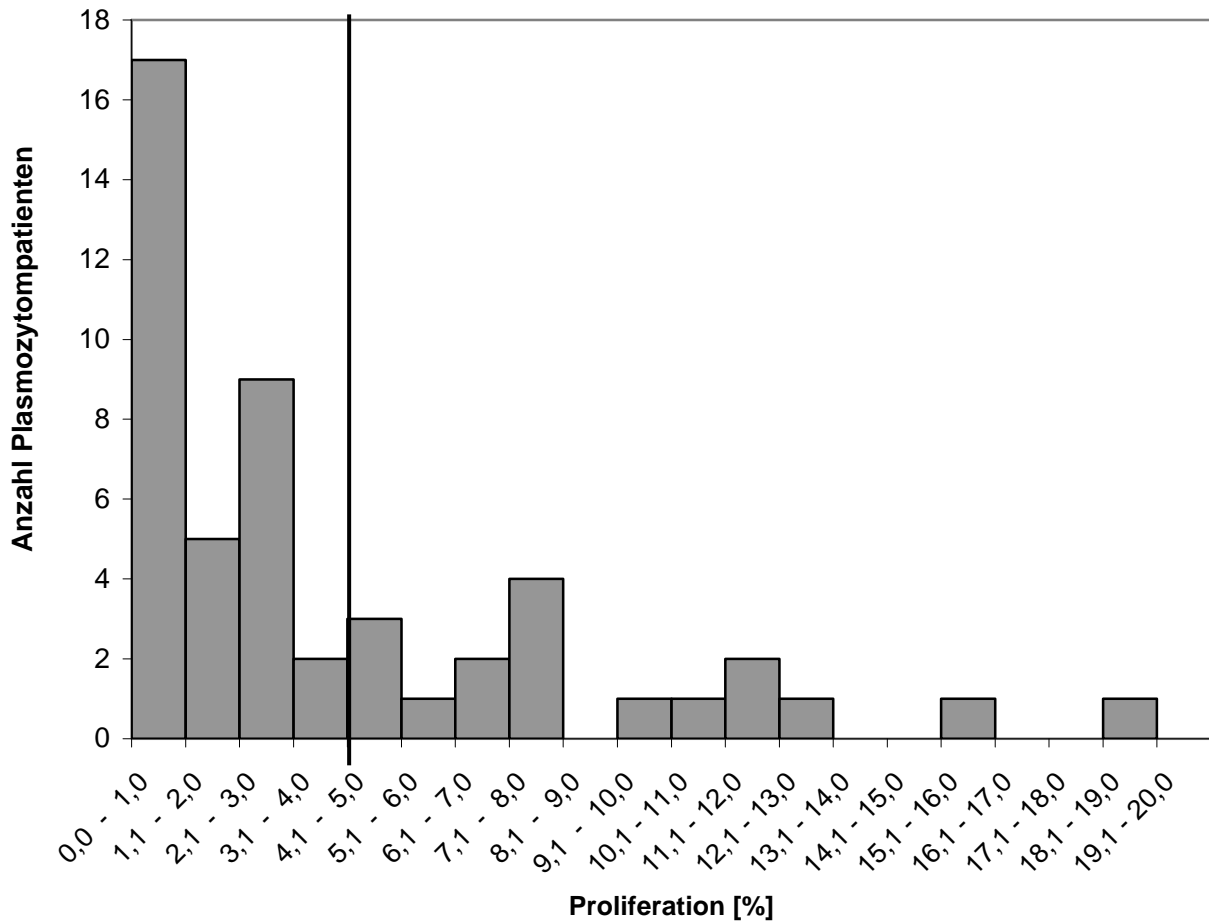


Abbildung 5:

Verteilung der Proliferationsaktivitäten der untersuchten Plasmazytome ermittelt mit Ki-S1. Der Mittelwert liegt bei 4,1% (durchgezogene Linie).

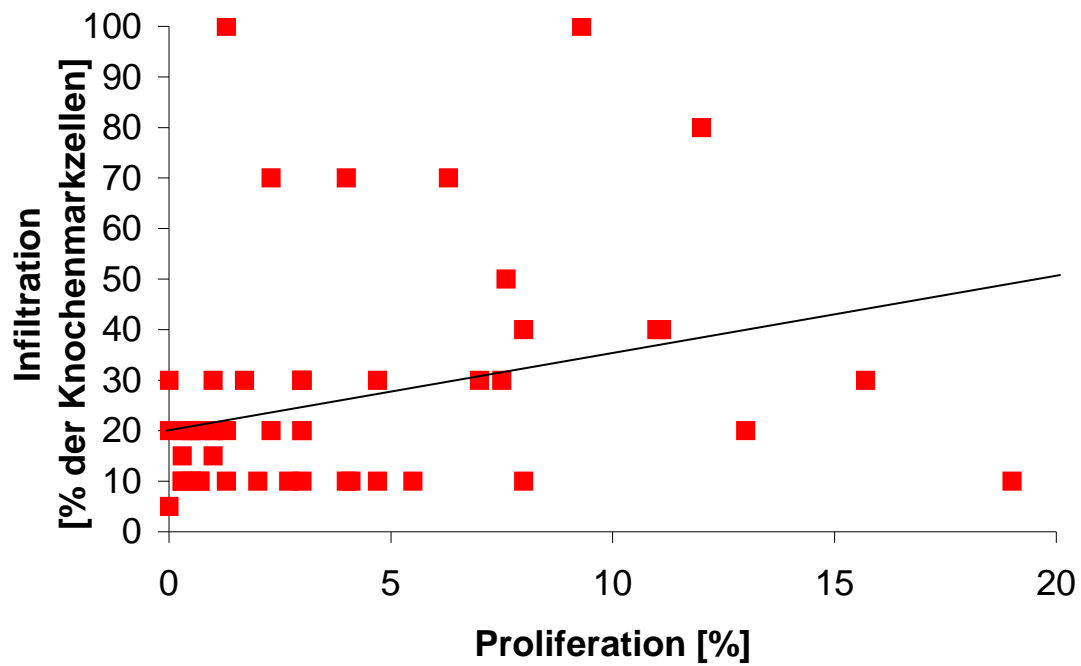


Abbildung 6:

Vergleich der Proliferationsaktivität der Plasmozytomzellen bestimmt durch Ki-S1 mit dem Infiltrationsgrad bei 50 Plasmozytomen im Knochenmark;

(Regressionsgerade $y = 1,4 x + 22$; $\alpha = 0,27$, $p = 0,06$, $R^2 = 0,07$)

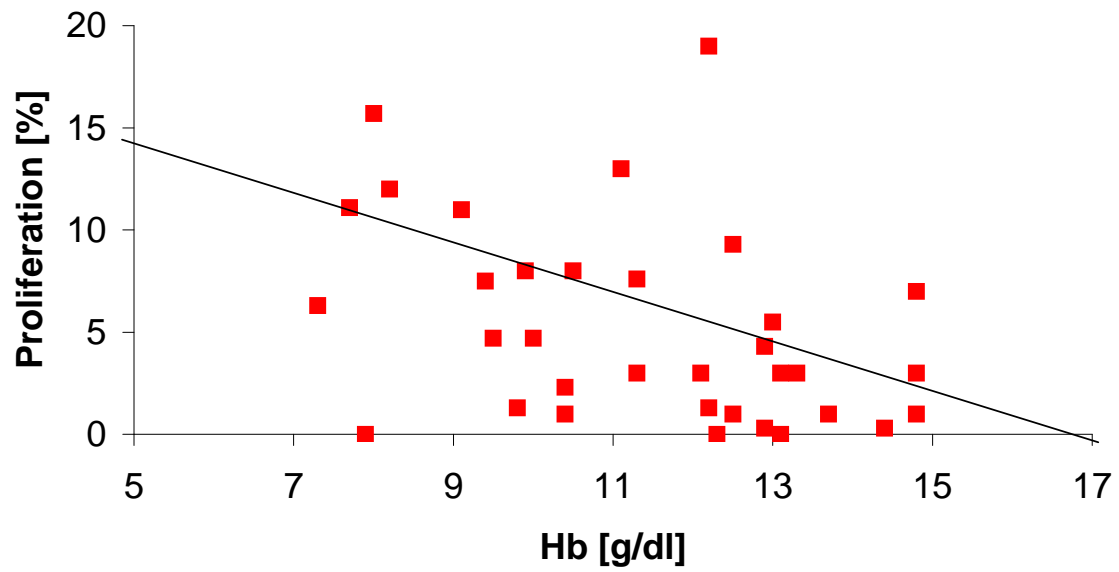


Abbildung 7:

Verteilung der Hämoglobinwerte zum Diagnosezeitpunkt bezogen auf die Proliferationsaktivität ermittelt durch Ki-S1

(Regressionsgerade $y = -0,8 x + 14,3$; $\alpha = -0,36$, $p = 0,04$, $R^2 = 0,13$)

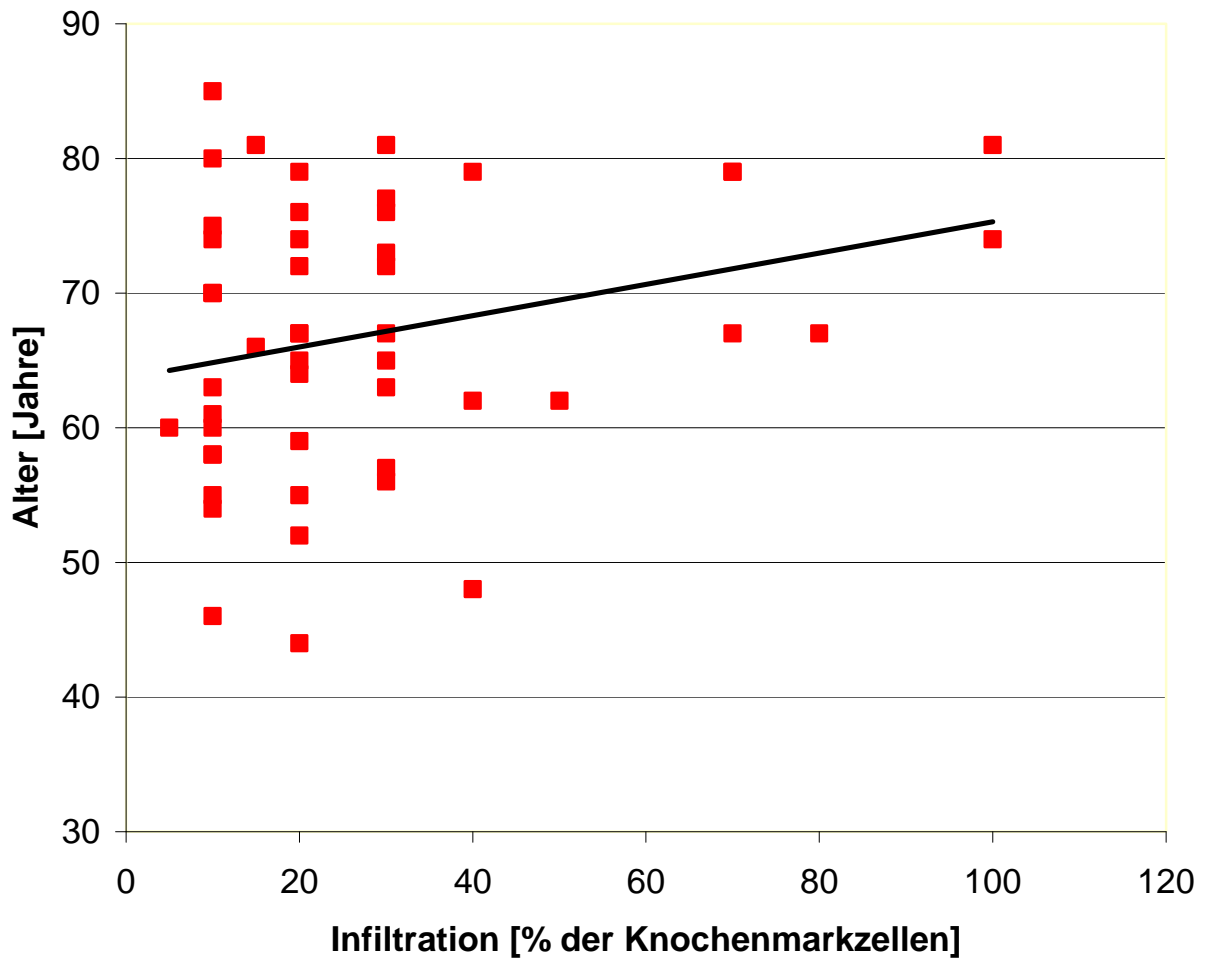


Abbildung 8:

Verteilung der Infiltrationsgrade der 50 untersuchten Plasmozytome bezogen auf das Lebensalter der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose

(Regressionsgerade $y = 0,12 x + 63,7$; $\alpha = 0,27$, $p = 0,06$, $R^2 = 0,07$)

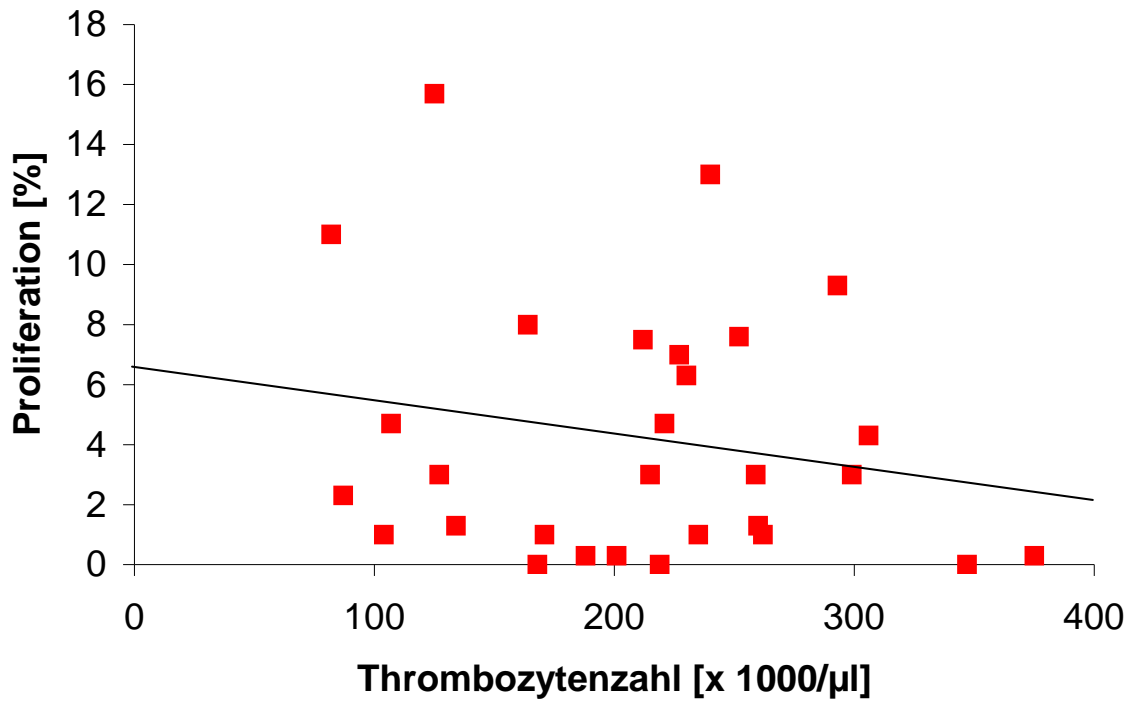


Abbildung 9:

Verteilung der Thrombozytenwerte zum Zeitpunkt der Diagnose bezogen auf die Proliferationsaktivität ermittelt durch Ki-S1

(Regressionsgerade $y = 0,01 x + 6,3$; $\alpha = -0,19$, $p = 0,17$, $R^2 = 0,03$)

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden 50 Beckenkammtrepanate von Patienten untersucht, die an einem Plasmozytom erkrankt waren.

Um Aussagen über den weiteren Verlauf der Erkrankung, bzw. zur Prognose machen zu können, wurde die Proliferationsrate der Tumoren ermittelt und ein Fragebogen sechs Jahre nach Diagnosestellung an die behandelnden Kliniken gesandt.

Abschließend lagen von 22 Patienten Daten über den weiteren klinischen Verlauf vor.

Bei der Auswertung der Proliferationsaktivität der untersuchten Plasmozytome fielen im Vergleich mit der Literatur niedrigere Werte auf. Bei den untersuchten Patienten wurden Proliferationsraten von durchschnittlich 4,08% (Median: 2,7%) ermittelt. Als eine Ursache für diese Differenz ließe sich die angewandte Methodik anführen. Durch die Doppelfärbung wurden zwei antigene Strukturen, die sich innerhalb einer Zelle befinden, markiert, die Topoisomerase II α im Zellkern und die im Zytoplasma exprimierte Leichtkette. Das Antigen für den MAK Ki-S1 ist die Topoisomerase II α , die in allen Phasen des Zellzyklus, außer in der G0-Phase exprimiert wird und im Zellkern lokalisiert ist (Boege et al. 1995). Zur Darstellung der durch die neoplastische Plasmazelle exprimierten Leichtkette wurden monoklonale Leichtkettenantikörper verwendet. Beide Antigene (Topoisomerase II α und κ - bzw. λ -Leichtkette) wurden mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert, wodurch auch im hochproliferativen Knochenmark und bei niedriger Infiltration die Definition einer Ki-S1-positiven Plasmazelle eindeutig möglich war.

In dieser Arbeit wurde eine sequentielle Doppelfärbung am Knochenmark durchgeführt. Als eine der ersten führte die Arbeitsgruppe um Pellegrini 1995 sequentielle Doppelfärbungen am Knochenmark von Patienten mit verschiedenen hämatologischen Erkrankungen durch. Ki-S1 ist für den Einsatz in Doppelmarkierungen geeignet, bei sequentieller Doppelmarkierung wurde dies durch Titius et al. 1994, Thiele et al. 1994 und Rudolph et al. 1995 bei verschiedenen Malignomen gezeigt.

Um Kreuzreaktionen zu vermeiden, wurden monoklonale Antikörper im Überschuss mit dem Präparat in den einzelnen Färbeschritten inkubiert. Ein Vorteil der sequentiellen Färbung ist, dass die Antikörper einzeln aufgetragen werden und die jeweilige Inkubationszeit berücksichtigt werden kann, im Gegensatz zur parallelen Färbung, bei der zwei unterschiedliche Antikörper mit der gleichen Inkubationszeit eingesetzt werden, woraus unspezifische Reaktionen des Antikörpers mit Gewebeanitgenen resultieren können. Diese können im Verlauf der Färbung zu einer unspezifischen Farbentwicklung im Präparat führen, dem sog. 'background'.

Die verwendeten Antikörper gehen mit ihren antigenen Determinanten keine kovalenten Bindungen ein, sondern die Bindung zwischen Antigen und Antikörper wird durch Ionen-Interaktionen, Wasserstoffbindungen oder van der Waals-Kräfte stabilisiert. Je nach Affinität des Antikörpers können Störeffekte mehr oder weniger zum Tragen kommen. Durch gründliches Spülen der Schnitte lassen sich Reaktionen des Antikörpers mit unspezifischen Gewebeanitgenen vermindern, wodurch der 'background' reduziert wird. Gleichzeitig kann dies aber auch zu einer reduzierten Darstellung des spezifischen Antigens führen, woraus sich eine schwache oder falsch negative Färbung ergeben kann.

Bei der Plasmazell Darstellung in dieser Arbeit tendierte v.a. der Leichtkettenantikörper zur 'background'-Bildung. Um dies zu reduzieren, wurden monoklonale Antikörper eingesetzt, die ein einziges Epitop auf der Leichtkette erkennen, und im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern weniger Kreuzreaktionen zeigen. Ebenso neigten die sekundären und tertiären Antikörper zu unspezifischen Gewebereaktionen und konnten Ursache für eine 'background'-Entstehung sein.

Da in der G0-Phase keine und in der frühen G1-Phase eine niedrige Expression des Ki-S1-Antigens vorherrscht (Camplejohn et al. 1993), konnte es zu falsch negativen oder zu niedrigen Proliferationsaktivitäten im Präparat kommen. Ursachen dafür wären zum einen eine Antigenzerstörung und zum anderen eine verstärkte Maskierung des Epitops bei verlängerter Fixation des Präparates, obwohl Ki-S1 ein sehr robustes Antigen ist (Kreipe et al. 1993 b). Da die Fixation durch die einsendenden Kliniken durchgeführt wurde, ließ sich in diesem Punkt keine Standardisierung erreichen.

Wegen des 'background', der Antigenzerstörung oder der mangelnden Demaskierung könnten in den Färbungen weniger Ki-S1-positive Zellen gezählt worden sein, da schwach positiv gefärbte Zellen als falsch negativ gewertet werden könnten. Das Mitzählen nicht neoplastischer Plasmazellen war unter diesen Versuchsbedingungen unwahrscheinlich, da Plasmozytome meist Tumorzellhaufen bilden und der Anteil von nicht maligne entarteten Plasmazellen im Knochenmark bei Plasmozytompatienten und Gesunden mit weniger als 1% sehr gering ist (Terstappen et al. 1990; Orfão et al. 1994). Daher ergab sich durch diese Residualzellen keine Beeinflussung der Bewertung der Proliferationsaktivität.

Im Vergleich mit den von Lokhorst et al. 1988 und Drach et al. 1992 publizierten Daten lagen die Proliferationsaktivitäten in dieser Arbeit niedriger. Erstere Arbeitsgruppe fand bei unbehandelten Plasmozytompatienten eine Proliferationsrate mit einem Median von 9,6% (bei Patienten mit rezidierten Plasmozytomen fanden sich sogar Proliferationsaktivitäten von 41,8%). Drach und Mitarbeiter ermittelten Proliferationsaktivitäten zum Diagnosezeitpunkt von im Mittel 11,9%, bei Rezidiven von 22,4%.

Lokhorst und Mitarbeiter untersuchten die Plasmozytome mit dem MAK Ki-67, der im Unterschied zu Ki-S1 nicht paraffingängig ist. Ki-S1 erkennt die Topoisomerase II α , ein 170 kDa großes Protein, welches sich von dem 345 bzw. 395 kDa großen Ki-67-Protein unterscheidet (Gerdes et al. 1991; Kellner et al. 1997).

In der Arbeit von Lokhorst et al. ließ sich zwischen Ki-67-positiven Zellen und dem ^3H -Thymidine-labelling index (der Anteil der Zellen, der sich in der S-Phase befindet) keine Korrelation aufzeigen. Es wurden zwei verschiedene Methodiken angewandt, um die Proliferationsaktivität zu ermitteln. Die Autoren beschrieben als mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen ^3H -Thymidin-labelling index und der Proliferationsaktivität, bestimmt durch Ki-67, dass a) ein intrazellulär bedingter Aufnahmestopp für die radioaktiv markierten Stoffe zu erniedrigten und b) proliferationsunabhängige DNA-Reparaturmechanismen zu erhöhten Werten führen könnten.

Drach und Koautoren ermittelten 1992 im Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie ebenfalls höhere Proliferationsaktivitäten von unbehandelten und rezidivierenden Plasmazytomen. Proliferierende Plasmazellen wurden ebenfalls, wie in der Arbeit von Lokhorst, durch den Nachweis des Ki-67-Proteins als Proliferationsmarker und durch den Nachweis von CD38 als Plasmazellmarker definiert. CD38 wird nicht ausschließlich von Plasmazellen auf der Oberfläche exprimiert, quantitativ gesehen ist die Expression in dieser Zellpopulation am höchsten.

In der aktuellsten Arbeit von Gastinne, Leleu und Kollegen 2007 wurde der Cut Off bezüglich der Proliferationsrate bei 4% angesetzt, da unabhängig vom Stadium, definiert durch das Internationale Staging System (ISS) (Greipp et al. 2005), die Plasmazytome mit einer höheren Proliferationsrate einen ungünstigeren Verlauf zeigten. Die Mediane der Proliferation lagen bei neu diagnostizierten Plasmazytomen im Stadium I nach ISS bei 3%, im Stadium II bei 6,1% und im Stadium III bei 6,5%. Diese Proliferationsraten sind vergleichbar mit den in dieser Arbeit ermittelten Zahlen. Ein ähnliches Ergebnis zeigte die Arbeit aus der Arbeitsgruppe um Alexandrakis 2004, in der der Cut Off bei 8% Proliferationsrate ermittelt durch Ki-67 gesetzt wurde. Auch hier zeigte sich, dass die Überlebenszeiten der Patienten mit einem Proliferationsindex > 8% geringer waren, eine Signifikanz lag nicht vor. Die Ergebnisse dieser beiden Arbeitsgruppen widersprechen jedoch den Ergebnissen der Arbeiten von Lokhorst und Drach und Mitarbeitern, die ebenfalls Ki-67 als Proliferationsmarker verwendeten. Im Vergleich mit den Daten dieser Arbeit, die Ki-S1 als Proliferationsmarker einsetzte, lassen sich die diskreten Unterschiede in den Proliferationsraten zu den Ergebnissen von Gastinne und Leleu, Median 2,7% versus Median 3 bis 6,5%, durch unterschiedliche Zellzyklus assoziierte Proteine, zum einen das Ki-67-Protein und zum anderen die Topoisomerase II α , die zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlicher Menge im Zellzyklus exprimiert werden, erklären. Durch Darstellung verschiedener Antigene resultieren unterschiedliche Proliferationsaktivitäten. Als weitere Ursache kann die in verschiedenen Anteilen eines Tumors unterschiedliche Zellkinetik zum Tragen kommen (Gerdes et al. 1984; Weiss et al. 1987; Schwartz et al. 1989).

In dieser retrospektiven Studie waren unter den 50 untersuchten Plasmazytompatienten zu gleichen Teilen Frauen und Männer betroffen. Im Mittel lag das Diagnosealter bei 67 Jahren. Die Expression der Leichtketten zeigte keine Geschlechtsbevorzugung, von 2/3 der Plasmazytome wurden kappa-Leichtketten exprimiert, die übrigen bildeten lamda-Leichtketten, entsprechend den Angaben in der Literatur (Bartl et al. 1986; Salmon und Cassady 1993).

Korrelierte man Infiltrationsgrad und Proliferationsaktivität, zeigte sich eine proportionale Abhängigkeit. Erwartungsgemäß zeigte das Knochenmark im Vergleich bei niedrig proliferierenden Plasmazytomen eine geringe, bei höher proliferierenden eine stärkere Infiltration. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die bereits oben erwähnte Arbeitsgruppe um Gastinne und Leleu. Skopelitou und Mitarbeiter (1994), die zwischen PCNA (proliferating cell nuclear antigen)-Expression und NOR (nuclear organizer region)-Gehalt einerseits und Histologie und Stadium der Plasmazytome andererseits Vergleiche zogen, zeigten ähnliche Ergebnisse.

Entsprechend der niedrigen Proliferationsaktivität war auch der Infiltrationsgrad der Plasmazytome (bestimmt durch den Anteil der Plasmazellen an allen Knochenmarkszellen) bei den untersuchten Patienten gering. 75% der untersuchten Patienten zeigten im Knochenmark einen Infiltrationsgrad von weniger als 30%, ähnliche Zahlen konnten Bartl und Mitarbeiter (1986) in ihrem Patientenkollektiv zeigen. Auch die Arbeitsgruppe um Gastinne und Leleu ermittelte bei 54 % der untersuchten Plasmazytome einen Infiltrationsgrad unter 30%.

Aufgrund der Rücklaufquote des Fragebogens konnten bezüglich der Überlebensrate 22 Patienten berücksichtigt werden. Auch wenn sich hinsichtlich der Merkmale Proliferationsaktivität, Infiltrationsgrad, Hämoglobinwert, Thrombozytenzahl, Alter und Geschlecht keine Unterschiede zu den 28 Patienten, von denen der weitere Krankheitsverlauf nicht bekannt war, feststellen ließen, war das statistisch verwertbare Patientenkollektiv klein.

Unterschiede ergaben sich zu den Arbeiten von Durie et al. 1980 und Schambeck et al. 1995, die einen ³H-Thymidin-labelling-index größer 1% gleichbedeutend mit einer schlechten Prognose setzten.

Bei den mittels Ki-S1 untersuchten Plasmozytompatienten ergab sich keine Korrelation zwischen dem Anteil der proliferierenden Zellen und dem Zeitpunkt des Therapiebeginns bzw. der Überlebenszeit.

Auch beim Vergleich Infiltrationsgrad und Überlebenszeit ergab sich in dieser Arbeit im Gegensatz zu den Arbeiten von Bartl et al. (1987), Baak et al. (1991) und Schambeck et al. (1995), die Plasmozytome mit einem Infiltrationsgrad kleiner 20% als niedrig maligne und mit größer 20% als hochmaligne definierten, keine Korrelation.

Andere Arbeiten zeigten bei anderen Tumorentitäten Korrelationen zwischen Ki-S1-Expression und Verlauf bzw. Prognose. Mammakarzinome zeigten eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit zwischen Ki-S1- bzw. Topoisomerase II α -Expression und der Überlebenszeit (Sampson et al. 1992; Kreipe et al. 1993 a, Rudolph et al. 1999). Eine proportionale Abhängigkeit zwischen Proliferation und histologischen Malignitätskriterien bei Melanomen und Weichteilsarkomen wurde durch Rudolph und Mitarbeiter (1995 und 1997) beschrieben.

Hämoglobinwert und Proliferation verhielten sich umgekehrt proportional, obwohl zwischen Infiltration und Hb-Wert keine Korrelation gezeigt werden konnte. Eine mögliche Erklärung ist die Wachstumshemmung der gesunden erythropoetischen Zellen durch Abgabe von Zytokinen durch den proliferativ aktiven, neoplastischen Plasmazellklon.

Bei jüngerem Lebensalter weist ein Trend auf einen höheren Infiltrationsgrad hin, ohne Nachweis einer Korrelation mit der Mortalität. Im Gegensatz dazu fanden Corso et al. 1998 bei jüngeren Patienten höhere Überlebensraten. In den übrigen laborchemischen Parametern und der klinischen Präsentation bei Erstvorstellung ließ sich ähnlich den in dieser Arbeit gefundenen Daten auch durch diese Arbeitsgruppe keine signifikante Differenz zwischen niedrigem und hohem Erkrankungsalter zeigen. Eine multiple Korrelation zwischen der Proliferation und den quantitativen Merkmalen, Infiltration, Alter, Hämoglobingehalt und Thrombozytenzahl ergab keinen neuen Aspekt bezüglich einer prognostischen Aussage.

Insgesamt sind die Ergebnisse heterogen und lassen keine endgültige Aussage über die prognostische Relevanz von Ki-S1 bei Plasmozytomen zu.

Bei anderen Malignomen, wie Mammakarzinom, Lymphomen oder Neuroblastom, werden spezifische Antikörper im Rahmen der Therapie bzw. bei Rezidiven bereits eingesetzt und sind ein gangbarer Weg bei der Anti-Tumor-Therapie. Auch bei der Behandlung des Plasmozytomrezidivs hat mittlerweile Bortezomib, ein Proteasomeninhibitor, in der klinischen Praxis seinen Einsatz gefunden (Dimopoulos et al., 2006; Liebisch und Peest 2007).

Der Einsatz monoklonaler Antikörper oder von Proteinen, die in das Proliferationsgeschehen entarteter Zellen eingreifen, ist viel versprechend für die weitere Therapie maligner Erkrankungen.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Beckenkammtrepanate von 50 Patienten untersucht, bei denen 1991 im Institut für Hämatopathologie im Zentrum für Pathologie und angewandte Krebsforschung der Kieler Universität die Diagnose eines Plasmozytoms gestellt wurde. Um Aussagen über den weiteren Verlauf der Erkrankung bzw. zur Prognose machen zu können, wurde in einer immunhistologischen Doppelfärbung die Proliferationsaktivität der untersuchten Plasmazytomzellen durch den monoklonalen Antikörper Ki-S1, der die Topoisomerase II α erkennt, bestimmt. Zur sicheren Identifikation der neoplastischen Plasmazellen wurde dann ein monoklonaler Antikörper gegen die selektiv exprimierte Immunglobulinleichtkette eingesetzt. Alter und Geschlecht, sowie die kappa- oder lamda-Leichtkettenexpression waren bei allen Patienten bekannt. Bei 66% der Patienten waren zum Diagnosezeitpunkt der Hämoglobinwert und bei 60% die Thrombozytenzahl bekannt.

Um Informationen über den weiteren Krankheitsverlauf der Patienten zu erhalten, wurde sechs Jahre nach Diagnosestellung ein Fragebogen an die behandelnden Ärzte gesandt. Abschließend lagen von 44% der Patienten Daten über den weiteren klinischen Verlauf vor.

Ziel dieser Arbeit war, die Proliferationsaktivität der Plasmazytome zu bestimmen und mit den klinischen Daten und dem Verlauf zu korrelieren.

Die Proliferationsaktivität der untersuchten Plasmazytome bestimmt durch Ki-S1 war z.T. niedriger als die in der Literatur gefundenen Angaben und lag im Mittel bei 4%.

Die Differenz zu den Ergebnissen anderer Untersucher ließ sich z.T. dadurch erklären, dass die Identifikation der neoplastischen Plasmazellen mit anderen Proliferationsmarkern durchgeführt wurde.

Ähnlich den Angaben in der Literatur waren bei den 50 untersuchten Plasmazytompatienten zu gleichen Teilen Männer und Frauen betroffen. Im Mittel lag das Diagnosealter bei 67 Jahren. Die Expression der Leichtketten zeigte keine Geschlechtsbevorzugung, von 2/3 der Plasmazytome wurden kappa-Leichtketten exprimiert, die übrigen bildeten lamda-Leichtketten.

Ebenfalls entsprechend den Literaturangaben zeigten 75% der untersuchten Patienten einen Infiltrationsgrad des Knochenmarks von weniger als 30%.

Korrelierte man Infiltrationsgrad und Proliferationsaktivität, zeigte sich eine proportionale Abhängigkeit. Erwartungsgemäß war das Knochenmark bei hoher Proliferation stärker infiltriert.

Keine Korrelation ließ sich zwischen Proliferationsaktivität bzw. Infiltrationsgrad und der Überlebenszeit nachweisen. Bei den untersuchten jüngeren Patienten wies ein Trend auf einen höheren Infiltrationsgrad ohne Einfluss auf die Mortalität hin. Bei den übrigen laborchemischen Parametern und der klinischen Präsentation bei Erstvorstellung ließ sich keine signifikante Differenz zwischen niedrigem und hohem Erkrankungsalter zeigen.

Umgekehrt proportional verhielten sich Proliferationsaktivität und Hämoglobinwert, obwohl sich zum Infiltrationsgrad keine Korrelation darstellen ließ. Eine mögliche Erklärung ist die selektive Hemmung der Erythropoese durch Abgabe von Zytokinen durch den proliferativ aktiven Plasmazellklon.

Um durch Korrelation mehrerer Merkmale eine prognostische Aussage machen zu können, wurde zwischen der Proliferation und den quantitativen Merkmalen Infiltration, Alter, Hämoglobinwert und Thrombozytenzahl eine multiple Korrelation durchgeführt. Daraus konnte keine prognostische Aussage abgeleitet werden.

6. Literaturverzeichnis

Alexandrakis MG, Passam FH, Kyriakou DS, Dambaki K, Ninirai M, Stathopoulos E (2004): Ki-67 Proliferation Index Correlation with prognostic Parameters and Outcome in Multiple Myeloma. *Am J Clin Oncol*, 27, 8-13

Alexanian R, Dimopoulos MA (1994): The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 330, 484-489

Alexanian R, Dimopoulos MA (1995): Management of multiple myeloma. *Semin Hematol*. 32, 20-30

Baak JPA (1991): Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis. Springer, Berlin

Bartl R, Frisch B, Fateh-Moghadam A, Kettner G, Jaeger K, Sommerfeld W (1987): Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am J Clin Pathol*. 87, 342-355

Boege F, Andersen A, Jensen S, Zeidler R, Kreipe H (1995): Proliferation-associated nuclear antigen Ki-S1 is identical with topoisomerase II α . Delineation of a carboxyl-terminal epitope with peptide antibodies. *Am J Pathol*. 146(6), 1302-1308

Caligaris-Cappio F, Bergui L, Tesio L, Pizzolo G, Malavasi F, Chilosi M, Campana D, van Camp B, Janossy G (1985): Identification of malignant plasma cell precursors in the bone marrow of multiple myeloma. *J Clin Invest*. 76, 1243-1251

Camplejohn RS, Brock A, Barnes DM, Gilett C, Raikundalia B, Kreipe H, Parwaresch R (1993): Ki-S1, a novel proliferative marker: flow cytometric assessment of staining in human breast carcinoma cells. *Br J Cancer* 67(4), 657-662

Cantoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J (1992): Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol.* 168, 357-363

Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, Macdonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY (1984): Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoklonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J Hist Cyto.* 32 (2), 219-229

Corso A, Klersy C, Lazzarino M, Bernasconi C (1998): Multiple myeloma in younger patients: the role of age as prognostic factor. *Ann Hematol.* 76 (2), 67-72

Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S, Picken E, Santana-Davilla R, Gonzalez-Paz N, Winkler JM, Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Dispenzieri A, Lacy MQ, Rajkumar SV, Lust JA, Greipp PR, Fonseca R (2003): Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 17 (2), 427-436

Dimopoulos MA, Kastritis E, Anagnostopoulos A (2006). Hematological malignancies: myeloma. *Ann Oncol.* 17 Suppl. 10, 137-143.

Drach J, Gattlinger C, Glassl H, Drach D, Huber H (1992): The biological and clinical significance of Ki-67 growth fraction in multiple myeloma. *Hematol Oncol.* 10, 125-134

Durie BGM, Salmon SE, Moon TE (1980): Pretreatment tumor mass, cell kinetics, and prognosis in multiple myeloma. *Blood* 55(3), 364-372

Durie BGM, Salmon SE (1975): A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer* 36, 842-854

Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Harrison TR (1998): Harrison`s principles of internal medicine. 14. Auflage, Mc Graw-Hill, New York, 713-730

Frahm SO, Zott B, Dworeck C, Steinmann J, Neppert J, Parwaresch R (1998): Improved ELISA proliferation assay (EPA) for the detection of in vitro cell proliferation by a new Ki-67-antigen directed monoclonal antibody (Ki-S3). J Immunol Methods 211, 43-50

Frahm SO, Rudolph P, Dworeck C, Zott B, Heidebrecht HJ, Steinmann J, Neppert J, Parwaresch R (1999): Immunoenzymatic detection of the new proliferation associated protein p100 by means of a cellular ELISA: specific detection of cells in cell cycle phases S, G2 and M. J Immunol Methods 223, 147-153

Gastinne T, Leleu X, Duhamel A, Moreau AS, Franck G, Andrieux J, Lai JL, Coiteux V, Yakoub-Agha I, Bauters F, Harousseau JL, Zandecki M, Facon T; Intergroupe Francophone du Myelome (IFM) (2007): Plasma cell growth fraction using Ki-67 antigen expression identifies a subgroup of multiple myeloma patients displaying short survival within the ISS stage I. Eur J Haematol 79(4), 297-304.

Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H (1984): Growth-fraction in malignant Non Hodgkin lymphoma as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. Hematol Oncol. 2, 365-371

Gerdes J, Li L, Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991): Immunobiochemical and molecular biologic characterisation of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. Am J Pathol. 138, 867-873

Gertz, MA (2007): Relevant prognostic features of multiple myeloma and the new International Staging System. Leuk Lymphoma 48(3), 458-468

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J (2005):

International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 20, 23(15), 3412-3420.

Hsu Su Ming, Raine L, Fanger H (1981): Use of Avidin-Biotin-Peroxydase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP). *J Hist Cyto.* 29 (4), 577-580

Kellner U, Heidebrecht HJ, Rudolph P, Biersack H, Buck F, Dakowski T, Wacker HH, Domanowski M, Seidel A, Westergaard O, Parwaresch R (1997): Detection of human topoisomerase II alpha in cell lines and tissues: characterization of five novel monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem.* 45, 251-263

Kellner U, Rudolph P, Parwaresch R (2000): Human DNA-topoisomerases – diagnostic and therapeutic implications for cancer. *Onkologie* 23, 424-430

Köhler G, Milstein C (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256 (5517), 495–497

Kreipe H, Alm P, Olsson H, Hauberg M, Fischer L, Parwaresch R (1993 a): Prognostic significance of a formalin-resistant nuclear proliferation antigen in mammary carcinomas as determined by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am J Pathol.*, 142, 651-657

Kreipe H, Heidebrecht HJ, Hansen S, Röhlk W, Kubbies M, Wacker HH, Tiemann M, Radzun HJ, Parwaresch R (1993 b): A new proliferation-associated nuclear antigen detectable in paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody Ki-S1. *Am J Pathol.*, 142, 3-10

Kreipe H, Parwaresch R: A closer look at the cell cycle (1993): Virchows Archiv A Pathol Anat., 422, 341-343

Kubagawa H, Vogler LB, Capra JD, Conrad ME, Lowton AR, Cooper MD (1979): Studies on the clonal origin of multiple myeloma. Use of individually specific (idiotype) antibodies to trace the oncogenetic event to its earliest point of expression in the B-cell differentiation. J Exp Med., 150, 792-807

Leder LD, Stutte HJ (1975): Seminar for hematologic-cytochemical techniques. Verh Dtsch Ges Pathol., 59, 503-509.

Liebisch P, Peest D (2008): Multiples Myelom, Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO), www.dgho.de

Lokhorst HM, Boom SE, Terpstra W, Roholl P, Gerdes J, Bast JEGB (1988): Determination of the growth fraction in monoclonal gammopathy with the monoclonal antibody Ki-67. Br J Haematol. 69, 477-481

Orfao A, Garcia Sanz R, Lopes Berges MC, Belen Vidriales M, Gonzalez M, Caballero MD, San-Miguel JF (1994): A new method for the analysis of plasma cell DNA content in multiple myeloma samples using a CD38/propidium iodide double staining technique. Cytometry 1, 17(4), 332-339

Pellegrini W, Facchetti F, Marocolo D, Salcvi L, Capucci A, Tironi A, Rossi G (1995): Assessment of cell proliferation in normal and pathological bone marrow biopsies: a study using double sequential immunophenotyping on paraffin sections. Histopathology 27(5), 397-405

Rudolph P, Lappe T, Schubert C, Schmidt D, Parwaresch R, Christophers E (1995): Diagnostic assessment of two novel proliferation-specific antigens in benign and malignant melanocytic lesions. Am J Pathol. 147(6), 1615-25

Rudolph P, Kellner U, Chassevent A, Collin F, Bonichon F, Parwaresch R, Coindre JM (1997): Prognostic relevance of a novel proliferation marker, Ki-S11, for soft-tissue sarcoma. A multivariate study. *Am J Pathol.* 150 (6), 1997-2007

Rudolph P, Knuchel R, Endl E, Heidebrecht HJ, Hofstader F, Parwaresch R (1998): The immunohistochemical marker Ki-S2: cell cycle kinetics and tissue distribution of a novel proliferation-specific antigen. *Mod Pathol.* 11, 450-456

Rudolph P, Mac Grogan G, Bonichon F, Frahm SO, de Mascarel I, Trojani M, Durand M, Avril A, Coindre JM, Parwaresch R (1999): Prognostic significance of Ki-67 and topoisomerases II α expression in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A multivariate analysis of 863 cases. *Breast Cancer Res Treat.* 55(1), 61-71

Salmon SE, Cassady JR (1993): Plasma cell neoplasmas. *Cancer: principles and practice of oncology.* 4. Auflage, Lippincott, Philadelphia, 1984-2025

Sampson SA, Kreipe H, Gillet CE, Smith P, Chaudary MA, Khan A, Wicks K, Parwaresch R, Barnes DM (1992): Ki-S1 - a novel monoclonal antibody which recognizes proliferating cells: evaluation of its relationship to prognosis in mammary carcinoma. *J Pathol.* 168, 179-185

Schambeck CM, Wick M, Bartl R, Lamerz R, Fateh-Moghadam A (1995): Plasma cell proliferation in monoclonal gammopathies: measurement using BU-1 antibody in flow cytometry and microscopy: comparison with serum thymidine kinase. *J Clin Pathol.* 48(5), 477-481

Schwartz BR, Pinkus G, Toder M, Weinberg DS (1989): Cell proliferation in Non-Hodgkin's lymphomas. (Digital image analysis of Ki-67 antibody staining). *Am J Pathol.* 134, 327-336

Shi SR, Key ME, Kalra KL (1991): Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 39 (6), 741-748

Skopelitou A, Tselenis S, Theocharia S, Agnantis N, Tsenga A, Elemenoglou J, Hadjiyannakis M, Kittas C (1994): Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and nucleolar organizer regions (NORs) in multiple myeloma. *Ant Can Res.* 14, 787-792

Steel, GG (1977): Growth kinetics of tumours. Clarendon Press, Oxford.

Terstappen LW, Johnsen S, Segers-Nolten IMJ, Loken MR (1990): Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high resolution flow cytometry. *Blood* 1, 76 (9), 1739-1747

Thiele J, Bertsch HP, Kracht LW, Anwander T, Zimmer JD, Kreipe H, Fischer R (1994): Ki-S1 and PCNA expression in erythroid precursors and megakaryocytes - a comparative study on proliferative and endoreduplicative activity in reactive and neoplastic bone marrow lesions. *J Pathol.* 173 (1), 5-12

Titius BR, Thiele J, Schaefer H, Kreipe H, Fischer R (1994): Ki-S1 and proliferating cell nuclear antigen expression of bone marrow macrophages. Immunohistochemical and morphometric study including reactive (inflammatory) myelitis, secondary aplastic anaemia, AIDS, myelodysplastic syndromes and primary (idiopathic) osteomyelofibrosis. *Acta Haematol.* 91(3), 144-149

Turley H, Comley M, Houlbrook S, Nozaki N, Kikuchi A, Hickson ID, Gatter K, Harris AL (1997): The distribution and expression of the two isoforms of DNA topoisomerases II in normal and neoplastic human tissues. *Br J Cancer* 75 (9), 1340-1346

Weiss LM, Strickler JG, Medeiros LJ, Gerdes J, Stein H, Warnke R (1987):
Proliferative rates of non-Hodgkin`s lymphomas as assessed by Ki-67 antibody. Hum
Pathol. 18, 1155-1159

7. Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Parwaresch (†) für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die Möglichkeit, die Untersuchungen am Institut für Pathologie, in der Sektion für Hämatopathologie und Lymphknotenregister des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchführen zu dürfen. Seine stets konstruktive Kritik und freundliche Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas waren für diese Arbeit von besonderer Bedeutung.

Herrn Professor Dr. Rudolph (†) möchte ich für die konstruktive Unterstützung der Auswertung und Korrektur dieser Arbeit danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Klapper danke ich sehr für die abschließende Betreuung bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

Herrn Professor Wacker danke ich für die Hilfe bei der Erarbeitung und Auswertung der Fragebögen und Herrn Professor Kreipe bei der initialen Betreuung und insbesondere bei der Beurteilung und Auswertung der Doppelfärbung.

Besonderer Dank gebührt der medizinisch-technischen Assistentin Frau Monika Hauberg für die Anleitung und Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen und für die ständige Ansprechbarkeit bei jedem Problem. Ebenso danke ich Frau Pflug für die geduldige Einweisung beim Schneiden der Paraffinblöcke.

Für die Photographien möchte ich mich bei Herrn Zeiser bedanken.

Für die statistische Auswertung der Daten möchte ich mich sehr bei Herrn Dr. Röhl, wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Otto-von-Guericke Universität in Magdeburg, bedanken.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Mitdoktoranden, mit denen das gemeinsame Arbeiten viel Spaß gemacht hat.

8. Lebenslauf

Name: Jessica Bokelmann, geb. Elsner
 Geburtsdatum: 24.01.1969 in Bremen
 Familienstand: verheiratet, 2 Kinder (1 Tochter, 1 Sohn)
 Schulbildung: Grundschule in Hambergen von 1975 bis 1979
 Orientierungsstufe in Hambergen von 1979 bis 1981
 Gymnasium in Osterholz-Scharmbeck von 1981 bis 1988
 Hochschulreife 16.05.1988 am Gymnasium Osterholz-Scharmbeck
 Studium: Christian-Albrechts-Universität zu Kiel von 1988 bis 1995
 Ärztliche Prüfung: Drittes Staatsexamen in Kiel am 12.06 1995
 AiP-Zeit: Zentrum für Kinderheilkunde an der Otto-von-Guericke-Universität zu Magdeburg von August 1995 bis Januar 1997
 Approbation: 4. März 1997, Landesamt für Gesundheit, Schleswig-Holstein
 Weiterbildung: Seit April 1997 Ausbildung zur Fachärztin für Kinderheilkunde am Zentrum für Kinderheilkunde an der Otto-von-Guericke-Universität zu Magdeburg
 Seit August 1999 Fortsetzung der Weiterbildung an der Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Universitätskinderklinik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
 Facharztanerkennung: 15. Juni 2005 Fachärztin für Kinder- und Jugendmedizin
 Beschäftigung: Seit dem 15. November 2005 angestellte Fachärztin an der Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel